



Centre de Coopération International en
Recherche Agronomique pour le Développement



Ecole Nationale Supérieure
Agronomique de Montpellier

Martin Notaro,

Elève **ingénieur agronome** en année de césure tutorée

RAPPORT DE STAGE :

SUIVI DÉMOGRAPHIQUE, ÉTUDE DU CYCLE DE VIE ET BARCODING DU THRIPS *ELIXOTHRIPS BREVISETIS*, RESPONSABLE DE LA ROUILLE ARGENTÉE SUR BANANIER



Maître de stage : Dominique CARVAL, Docteur en écologie : Epidémiologie et dynamique spatiale des bioagresseurs et modélisation, UR26 Systèmes de culture bananiers, plantains, et ananas, CIRAD

Co-maître de stage : Philippe RYCKEWAERT, Docteur en entomologie : Agroécologie, Interactions et Régulations Biologiques dans les systèmes horticoles (Airb), UR103HortSys, CIRAD

Tuteur pédagogique : M. Jacques WERY, ingénieur en agronomie, professeur à Montpellier SupAgro, Directeur du département « Milieu, Productions, Ressources et Systèmes »(MPRS) et Directeur de l'UMR « Fonctionnement et Conduite des Systèmes de Cultures Tropicales et Méditerranéens »

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dominique Carval, mon maître de stage, qui m'aura beaucoup apporté, essentiellement lors de la partie de production et d'analyse de données statistiques et cartographiques, mais aussi lors de la mise en place de l'essai sur l'exploitation « Fijo ».

Je voudrais aussi dire merci à Philippe Rickwaert, mon co-maître de stage, de l'aide apporté au début du stage pour me familiariser avec *E. brevisetis*, thrips de l'étude et de m'avoir accompagné à plusieurs reprises dans l'exploitation de « Soudon » pour effectuer des reconnaissances de thrips.

Je tiens aussi à faire part de ma satisfaction auprès du reste de la « banana team » qu'ils soient chercheurs, techniciens, post doctorant, ou ingénieur VSC avec qui j'ai toujours passé de bons moments lors des pauses café.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel travaillant au CIRAD du Campus agro-environnemental Caraïbe.

Enfin, je voudrais saluer l'ensemble de l'équipe « Poulet Boucané », Audich, Rémichoupette, Margarita, Salmita et Damdoun, sans qui mon séjour en Martinique n'aurait pas été rempli de rigolades de folie comme il l'a été, aussi bien au travail qu'en dehors !

Et aussi un petit clin d'œil pour Laëti et Amé, colocataires de choc de l'été dernier à Balandran qui auront suivi le même chemin que moi jusqu'à Madinina !

SOMMAIRE

PRESENTATION DU CIRAD	5
LE CAMPUS AGRO-ENVIRONNEMENTAL CARAÏBES	5
LE DEPARTEMENT PERSYST	5
L'UNITE DE RECHERCHE « SYSTEME DE CULTURE BANANIER PLANTAINS/ANANAS »	6
INTRODUCTION	7
1) ROUILLE ARGENTEE EN BANANERAIE : GENERALITES	8
1.a La rouille argentée	8
1.b D'Hercinothrips femoralis à Elixothrips brevisetis	8
1.c Présentation de l'ordre des thysanoptères	9
1.d Comparaisons taxonomiques	9
1.e Connaissances et biologie du bananier	10
2) LE SUIVI DEMOGRAPHIQUE	10
2.a Choix de la bananeraie	11
2.b Echantillonnage de la parcelle	11
2.c Méthode de suivi	12
2.d Analyses statistiques	12
2.e Résultats	14
2.f Discussion et conclusion	16
3) L'ETUDE DU CYCLE DE VIE	16
3.a L'élevage de thrips et les méthodes employées	17
3.b Résultats des essais d'élevage	18
3.c Proposition d'améliorations des méthodes d'élevage	18
4) LE PRINCIPE NOVATEUR DU BARCODING	19
4.a Le barcode : un outil d'identification trophique et taxonomique	19
4.b Séquençage des thrips rencontrés	20
4.c Propositions d'amélioration de protocole	20
CONCLUSION	22
ANNEXES	23
WEBOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHIE	43

TABLE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1. Similarités et différences entre <i>E. brevisetis</i> et <i>H. femoralis</i>	9
Tableau 2. Fiche de relevés de terrain	25
Figure 1. Photo de rouille argentée visible sur un régime.....	8
Figure 2. Photos d' <i>E. brevisetis</i> à gauche (Philippe Ryckwaert, CIRAD) et d' <i>H. femoralis</i> à droite (source internet Shizuoka University).....	8
Figure 3. Photos d' <i>E. brevisetis</i> à gauche et d' <i>H. femoralis</i> à droite montés entre lame et lamelle (Bruno Michel, CIRAD).....	10
Figure 4. Situation géographique de l'exploitation et de ses parcelles ainsi que de la bananeraie de l'étude (contour bleu)	11
Figure 5. Parcelle "Fruit à pain" (en bleu) où a eu lieu l'étude et parcelle d'étude (contour jaune)	12
Figure 6. Positions des bananiers étudiés sur la parcelle	12
Figure 7. Photographie des essais d'élevage en chambre climatique	17
Figure 8. Schéma présentant les différents stades du cycle de vie d' <i>E. brevisetis</i>	18
Figure 9. Schéma présentant les améliorations possibles des méthodes d'élevage	19
Figure 10. Organigramme général du CIRAD	23
Figure 11. Arbre phylogénétique de l'ordre des thysanoptères	24
Figure 12. Ebauche d'un plan d'échantillonnage fictif de la parcelle	26
Figure 13. Schéma pour visualiser les zones clés à observer.....	27
Figure 14. Cartes de pressions du ravageur à différentes semaines de l'expérimentation	28
Figure 15. Boîte à moustache du type de feuille en fonction de la hauteur du rejet	29
Figure 16. Graphique présentant la hauteur du rejet en fonction du nombre de feuilles le composant	29
Figure 17. Graphiques montrant un lien exponentielle entre le nombre de thrips du rejet et la hauteur du rejet.....	30
Figure 18. Photographie d'un vitroplant de bananier	34
Figure 19. Photographie de l'adventice <i>Peperomia pellucida</i>	35
Figure 20. Photographie de la plante adventive <i>Diffenbachia seguine</i>	35
Figure 21. Photographie de l'adventice <i>Alocasia cucullata</i>	36
Figure 22. Photographie de la plante adventive <i>Mikania micrantha</i>	36
Figure 23. Explications et schémas du principe de la PCR.....	37
Figure 24. Photographie d'un gel d'électrophorèse révélé aux UV.....	42

PRESENTATION DU CIRAD

Le CIRAD, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, est un organisme de recherche français public placé sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère des Affaires étrangères et européennes. Son objectif principal est la résolution des enjeux planétaires de l'agriculture et du développement d'aujourd'hui et de demain, dans un monde confronté à des mutations socio-économiques et environnementales permanentes. Grâce à de nombreux partenariats conclus avec plusieurs pays du Sud, le CIRAD fait naître de nouvelles connaissances théoriques et techniques qu'il diffuse largement pour accompagner le développement agricole des pays émergents et contribuer aux grands débats agronomiques.

Le CIRAD dispose de partenariats diversifiés à travers le monde jouant un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'établissement. Au fur et à mesure de son déploiement international, le CIRAD s'est constitué un vaste réseau de relations qui ont permis la construction de connaissances scientifiques, socio-économiques, culturelles et politiques des contextes locaux nécessaires pour atteindre les objectifs fixés de développement agricole. A ce jour, pas moins de 12 directions régionales sont implantées à la surface du globe, à partir desquelles le CIRAD mène des activités de coopération avec plus de 90 pays (cf. annexe 1, organigramme général du CIRAD).

Enfin, citons quelques chiffres permettant de se rendre compte de l'importance économique et sociale d'un tel organisme de recherche. Au total, 1800 agents sont employés, parmi lesquels figurent 800 chercheurs, qui se répartissent dans trois départements scientifiques (Bios, Persyst, ES) regroupant 37 unités de recherche.

LE CAMPUS AGRO-ENVIRONNEMENTAL CARAÏBES

Le Campus Agro-environnemental Caraïbes regroupe 2 EPST (Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique) et un EPIC (Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial) qui interviennent dans le domaine de la recherche et du développement agricole en Martinique. Il s'agit de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement, EPST), de l'Irstea (Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture, EPST) ainsi que du CIRAD (EPIC). Ce pôle a été créé dans le but d'améliorer les systèmes agricoles en les diversifiant et en mettant au point des outils/techniques durables pour les Antilles françaises ainsi que les autres îles de la Caraïbe.

LE DEPARTEMENT PERSYST

Persyst, Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux, est le département du CIRAD auquel je suis intégré et dont les recherches sont liées aux processus biologiques en interaction avec les conditions environnementales et les interventions techniques. Les expérimentations sont réalisées à l'échelle de la parcelle, du troupeau, de l'exploitation agricole ou du produit tout au long de la filière de transformation. Elles concernent les relations entre le génotype, l'environnement et le système technique. Ses études s'appuient sur les concepts et les outils de l'agronomie et de la zootechnie, de l'analyse des systèmes, de l'aide à la décision, de l'écologie fonctionnelle et de l'ingénierie des procédés. Elles débouchent sur la conception, l'évaluation et la mise en œuvre de systèmes agricoles, sylvicoles et pastoraux et de procédés de

transformation des produits, sur l'étude de l'impact environnemental des pratiques agricoles et sur l'analyse de l'élaboration de la qualité au sein d'une filière.

L'UNITE DE RECHERCHE « SYSTEME DE CULTURE BANANIER PLANTAIN/ANANAS »

Pour mieux saisir les tenants et aboutissants du travail global mené au cours du stage, il est nécessaire de présenter l'unité de recherche dont je fais partie. A travers les recherches menées, l'unité a un triple objectif :

- Réduire les impacts environnementaux négatifs des grandes plantations de bananes et d'ananas, en particulier diminuer l'utilisation des intrants chimiques.
- Développer des productions à forte valeur ajoutée dans les DOM (Guadeloupe, Martinique, Réunion) pour contribuer à la stabilité socio-économique de ces zones de production.
- Favoriser la sécurité et l'indépendance alimentaire des pays producteurs de plantains en améliorant les performances des systèmes de culture.

Plusieurs axes de recherches sont développés :

- Comprendre le fonctionnement des systèmes de culture, en particulier les relations entre diversité au sein de l'agrosystème et sa durabilité, les dynamiques de populations et la dispersion des bio-agresseurs.
- Développer des méthodes innovantes de diagnostic, de pilotage et de conception de systèmes de culture basés sur l'utilisation d'indicateurs et de modèles.
- Développer les méthodes permettant l'utilisation de nouvelles variétés améliorées dans les systèmes de culture.
- Comprendre le fonctionnement des marchés.

Une des principales valeurs ajoutées de l'unité est de réunir au sein d'une même équipe, agronomes, écologues, modélisateurs, phytopathologistes, écophysiologistes, économistes. Cette organisation permet de fédérer des compétences complémentaires pour répondre aux enjeux de développement et aux questions de recherche qui y sont associées : la connaissance du déterminisme de la fertilité des sols associée à celle de la dynamique de développement des bioagresseurs, des conditions d'accès aux marchés, sont des données essentielles pour développer des itinéraires techniques innovants plus respectueux de l'environnement.

INTRODUCTION

On relève aujourd'hui plus de 120 pays producteurs de bananes à cuire ou bien dites « dessert » à travers le monde, dans des zones au climat tropical humide. En seulement trente ans, la production mondiale de bananes dessert a plus que doublée : en 2010, le chiffre de 50 millions de tonnes a été enregistré, dont 30% sont destinés à l'exportation. La banane représente le quatrième aliment de base consommé à l'échelle de la planète, derrière le riz, le blé et le maïs, mais occupe le premier rang de la production fruitière. C'est dire à quel point la culture bananière contribue à la sécurité alimentaire et financière, particulièrement dans les pays défavorisés. Toutefois, cette production peut s'avérer fragile face à toutes les contraintes extérieures existantes, notamment par rapport aux agents macro ou microbiologiques tels que les champignons, les bactéries et certains insectes. Déjà par le passé, au milieu du XX^{ème} siècle, une maladie décimant la culture avait fait des ravages. A cette époque était principalement cultivée la variété de bananes dessert appelée « Gros Michel », progressivement attaquée par la « maladie de Panama », ou fusariose (champignon tellurique), à partir des années 1940. Par la suite, cette variété fut systématiquement remplacée par des bananes résistantes à la maladie : les Cavendish. Mais la fusariose a trouvé des moyens pour contourner les systèmes de résistance des bananiers. Par ailleurs des insectes tels que les charançons à l'état larvaire ou bien des microorganismes tels que les nématodes occasionnent de sérieux dommages au niveau des bulbes causant des préjudices importants pouvant aller parfois jusqu'à la chute du bananier. De plus depuis les années 1970, une nouvelle maladie, la cercosporiose noire, causée par le champignon *Mycosphaerella fijiensis*, microorganisme phytopathogène nécrotrophe détruisant les cellules chlorophylliennes des bananiers, cause de sérieux problèmes de rendement.

Et depuis cette même période une maladie appelée « rouille argentée », visible sur le péricarpe des bananes formant des tâches à l'aspect argenté qui se distinguent particulièrement une fois le fruit arrivé à maturité, est apparue. Même si les fruits ne sont pas impropres à la consommation, les normes de commercialisation européennes ne permettent pas aux fruits atteints d'être placés sur les étales des grandes surfaces. Jusqu'en 1996, cela causait de grandes pertes économiques pour les exploitations bananières des Antilles françaises. Cette année là, des travaux de recherche pour limiter cette maladie ont permis de mettre en place une méthode de lutte, simple et efficace, qui fut alors systématiquement adoptée en Martinique et Guadeloupe: le gainage des régimes portant les fruits. Les pressions économiques se faisant fortes à cause de l'impossibilité pour les producteurs d'exporter une bonne partie de leur marchandise, les recherches s'étaient donc axées préférentiellement sur des aspects de protection et d'enrayement du phénomène plutôt que sur sa compréhension.

L'objet de notre étude est de comprendre le processus dans son ensemble : savoir quand et comment apparaissent les taches de rouille argentée et donc cibler l'origine de ces dégâts, car jusqu'à aujourd'hui aucune étude n'a prouvé qu'il s'agissait bel et bien du thrips *Elixothrips brevisetis*. A cette expérimentation, d'autres viennent s'ajouter pour compléter mon stage, l'objectif étant de discerner dans toute sa complexité le fonctionnement de ce thrips en bananeraie comme en cage d'élevage. Par ailleurs des travaux de recherche en biologie moléculaire seront réalisés ainsi que des tests de plantes adventices en culture bananière afin de déterminer leur potentiel hôte vis-à-vis du thysanoptère.

1) ROUILLE ARGENTEE EN BANANERAIE : GENERALITES

1.a La rouille argentée



On appelle rouille argentée les dégâts présents sur le péricarpe des bananes suite à l'action de thrips. Ces thysanoptères, qui sont des insectes piqueur-suceur, se nourrissent sur la peau des bananes en vidant les cellules de leur contenu. Ces dernières sont alors remplies d'air, et se convertiront progressivement en plages décolorées et argentées visibles à l'œil nu. Au cours du processus de maturation, ces zones brunissent et se subérifient à cause de l'oxydation des tanins, due à des polyphénols oxydase, certainement apportés par le thrips lors de son alimentation.

Figure 1. Photo de rouille argentée visible sur un régime

1.b D'Hercinothrips femoralis à Elixothrips brevisetis

Hercinothrips femoralis et *Elixothrips brevisetis* sont deux insectes jugés responsables de la présence de rouille argentée sur certains fruits de bananiers. Ils appartiennent tous deux à l'ordre des thysanoptères constitué exclusivement par toutes les familles et espèces de thrips, et même plus puisqu'ils sont classés dans la même sous-famille, celle des Panchaetothripinae. Historiquement, c'est *H. femoralis* qui est premièrement apparu et qui a causé les dommages décrits ci-dessus dans la production de bananes martiniquaises. Mais en 1996, de nouvelles identifications de thrips ont été menées sur les exploitations où *H. femoralis* était présent auparavant, à cause de dégâts de rouille argentée accrus, et cette fois, seul *E. brevisetis* avait été rencontré. Depuis cette période, *H. femoralis* n'a jamais été retrouvé dans les Antilles françaises.



Figure 2. Photos d'*E. brevisetis* à gauche (Philippe Ryckwaert, CIRAD) et d'*H. femoralis* à droite (source internet Shizuoka University)

1.c Présentation de l'ordre des thysanoptères

Les thrips sont des insectes au corps allongé, de taille inférieure à 2mm, et ils sont dits ptérygotes hétérométaboles, c'est-à-dire possédant des ailes dont la formation est relativement tardive au cours du développement. Certains sont capables de voler, sur de courtes distances cependant, d'autres sont complètement inaptes et ne peuvent donc que sauter pour fuir un danger. Aujourd'hui ce groupe contient plus de 5000 espèces de thrips réparties dans plus de 850 genres. Nous avons construit l'arbre phylogénétique (annexe 2). La plupart des espèces sont phytophages, se nourrissant de plantes et de pollens, alors que d'autres s'alimentent de champignons. Certaines espèces sont prédatrices et se nourrissent d'œufs d'insectes, parfois même de thysanoptères phytophages. Toutes sont munies de pièces buccales piqueuses-suceuses. Comme tous les insectes, les thrips sont munis d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen. Leur système circulatoire sommaire est ouvert sur une vaste cavité coelomique rempli d'hémolymphe. Enfin, le système respiratoire est constitué de trachées qui possèdent des ramifications permettant d'acheminer l'O₂ au plus près des tissus. Par leur nombre important et leur très petite taille, la détermination d'espèces est difficile. Elle se base essentiellement sur la présence de soies ou de segments par exemple, leur nombre, leur position, etc.

1.d Comparaisons taxonomiques

	Similarités	Différences
D'aspect général	Corps marron foncé	<i>E. brevisetis</i> est de plus petite taille (1,2mm) que <i>H. femoralis</i> (1,8mm)
Tête	Tête jaunâtre 8 segments antennaires	Chez <i>femoralis</i> , le sensorium dépasse toujours légèrement l'apex des segments III et IV
Thorax	Tarses composés de 2 segments jaunâtres	-Tibias plutôt bruns chez <i>E. brevisetis</i> alors qu'ils sont jaunes chez <i>H. femoralis</i> . -Les ailes diffèrent aussi : <i>E. brevisetis</i> a des ailes antérieures blanches avec une base noire et deux bandes transversales marron et courtes alors que <i>H. femoralis</i> les a marron foncé, avec l'apex et la base de couleur pâle, de taille moyenne. -Pronotum, mesanotum et métanotum de <i>femoralis</i> possèdent tous les trois des soies médianes ou discales tandis que <i>brevisetis</i> a des soies qui ne poussent que sur la moitié postérieure du métanotum
Abdomen	10 sclérites	-Segment abdominal fortement resserré -Soies courtes sur le tergite IX chez <i>E. brevisetis</i> (1/3 du X), plus longues chez <i>H. femoralis</i> -Scission médiane complète du tergite X pour <i>E. brevisetis</i> + apex plus élargi et courbé vers la droite par rapport à <i>H. femoralis</i>

Tableau 1. Similarités et différences entre *E. brevisetis* et *H. femoralis*

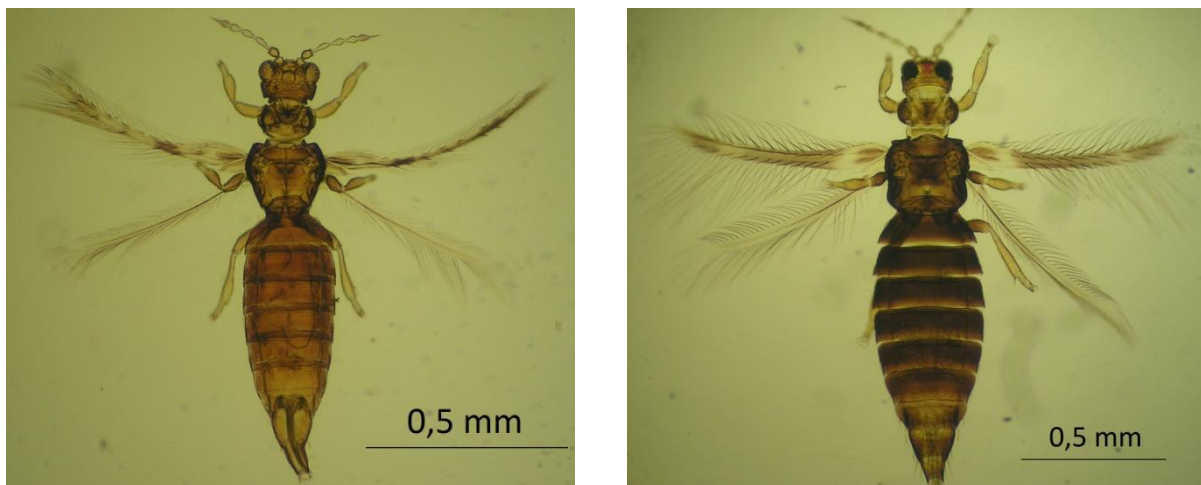


Figure 3. Photos d'*E. brevisetis* à gauche et d'*H. femoralis* à droite montés entre lame et lamelle (Bruno Michel, CIRAD)

1.e Connaissances et biologie du bananier

Le bananier est une herbe monocotylédone de grande taille. La tige aérienne n'est pas végétative, donc toutes les parties ostensibles du bananier proviennent de la tige souterraine. Il s'agit du centre vital du bananier puisque c'est à partir de là que se forment les racines, les feuilles ainsi que l'inflorescence. De plus c'est aussi à ce niveau que se différencient les rejets, ou bananier fils. Des racines sont émises tout au long de la phase végétative de croissance. La tige aérienne, ou pseudo-tronc, provient de l'imbrication de gaines foliaires les unes dans les autres. « Le cigare foliaire », d'où émanent les feuilles de la plante, ainsi que l'inflorescence ensuite monte par le centre des gaines foliaires avant d'atteindre la partie apicale. Le système foliaire est très développé et sa structure présente des spécificités liées aux contraintes de l'alimentation hydrique. L'inflorescence donnera une hampe où seront situées les fleurs femelles donnant les bananes dans sa partie supérieure (aussi appelé régime), et la popote contenant les fleurs mâles dans la partie inférieure.

Concernant le moment où le thrips cause les dégâts de rouille argentée par succion du contenu cellulaire des « peaux » de bananes, la littérature spécialisée diverge. Il peut être écrit que ces dégâts apparaissent très tôt, dès la fructification de la première main femelle, même si la plupart des scientifiques s'accordent sur une apparition plus tardive des dommages de rouille, après le stade dernière main femelle découverte. C'est un des aspects autour de la rouille qui devra être vérifié grâce aux observations de terrain, savoir quand et comment les dégâts surgissent.

2) LE SUIVI DEMOGRAPHIQUE

Etudier une population de thrips à l'état sauvage en bananeraie nous a semblé nécessaire au vu des connaissances sur son développement et fonctionnement plutôt légères. Ainsi, nous espérons pouvoir identifier les paramètres climatiques, anthropiques (pratiques agricoles : effeuillage, traitements phytosanitaires...) et biologiques (stade de développement des bananiers) influençant son évolution démographique. De plus, nous voudrions pouvoir caractériser l'apparition de la rouille argentée et savoir quand *E. brevisetis* se nourrit du contenu cellulaire des péricarpes de bananes.

2.a Choix de la bananeraie

La bananeraie a été sélectionnée sur l'EARL Fijo pour plusieurs raisons. La première évidente a été de constater la présence notable du thrips étudié sur l'exploitation. La seconde portait sur le stade de développement des bananiers de la parcelle choisie. L'objectif est d'effectuer le suivi démographique sur une parcelle où les stades de développement des bananiers sont relativement proches. Nous avons choisie une parcelle de second cycle facilement accessible, la parcelle « fruit à pain ». Enfin, nous avons obtenu le droit de l'exploitation de laisser découvert la moitié des régimes de l'étude, et donc de ne pas les engainer, pour augmenter nos chances d'observation du phénomène ayant pour conséquence l'apparition de la rouille argentée.

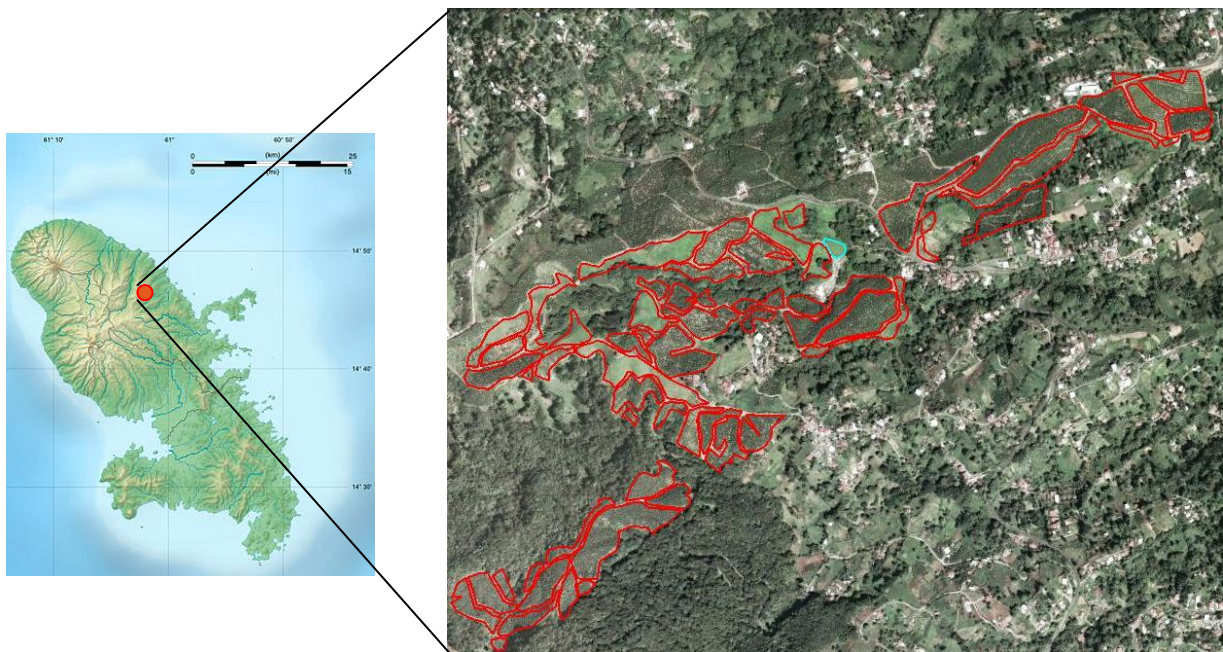


Figure 4. Situation géographique de l'exploitation et de ses parcelles ainsi que de la bananeraie de l'étude (contour bleu)

2.b Echantillonnage de la parcelle

Sur la parcelle, 30 bananiers ont été sélectionnés (une moitié dont le régime sera engainé, et l'autre moitié non) de façon à ce que leur répartition soit homogène dans un périmètre établi ayant une forme rectangulaire. Ainsi nous avons obtenu un repère orthogonal nous permettant d'avoir une projection bidimensionnelle du positionnement des bananiers sélectionnés. Des mesures de distance par rapport aux axes x et y ont été effectuées pour obtenir une projection en deux dimensions de la parcelle, et pouvoir par la suite faire, par exemple, des cartes de niveau d'infestation/de pression environnementale du thrips.



Figure 5. Parcelle "Fruit à pain" (en bleu) où à eu lieu l'étude et parcelle d'étude (contour jaune)

2.c Méthode de suivi

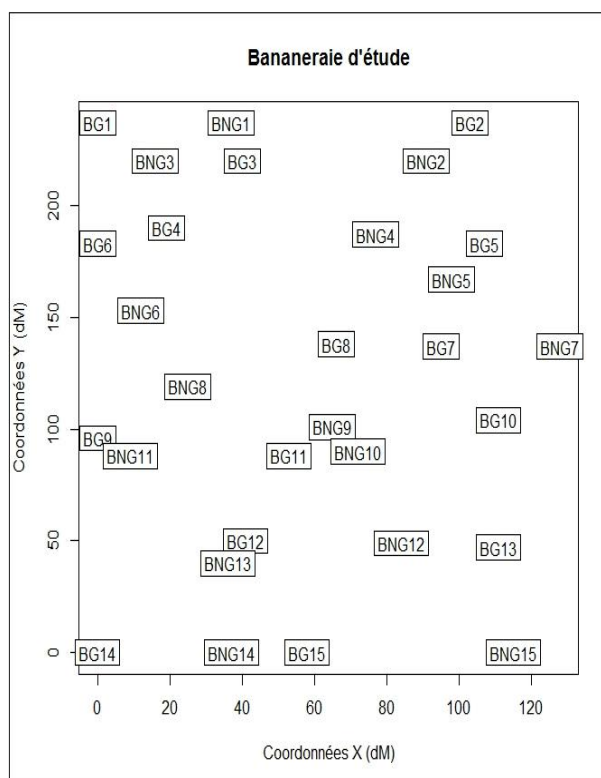


Figure 6. Positions des bananiers étudiés sur la parcelle

Dans le but de caractériser les variables agronomiques et biologiques favorisant le développement des populations de thrips, un suivi temporel a été effectué des variables de réponses (*e.g.* nombre de thrips sur le rejet, sur le pied mère). La fréquence des relevés est de 3 par semaine (lundi, mercredi et vendredi matin) exceptés les jours de pluie. Au cours de ceux-ci les comptages du nombre de thrips présents ont été faits sur la totalité des rejets, sur la base des 4 feuilles les plus anciennes des bananiers-mères, ainsi qu'au niveau de la hampe, des fleurs et des fruits dès la mise en place du régime. De plus, la hauteur des rejets a été mesurée et la composition des types de feuille des rejets (lancéolée ou oblongues) a été caractérisée, chaque. Les résultats seront par ailleurs mis en relation avec des données météo fournies par météo France, l'heure au moment des observations, ou encore avec les plantes adventices présentes au sol. Des commentaires propres à chaque observation comme la présence de larves ou d'autres espèces de thrips ont également été précisés. La fiche de suivi est présente en annexes (annexe 3).

Enfin si des thrips sont vus sur des jeunes fruits, plus de temps sera passé pour leur observation et si un comportement de prise alimentaire est adopté, alors la/les banane(s) en question seront marquées et suivies au cours du temps pour voir l'évolution des piqûres sur les fruits. Si l'hypothèse de départ est vérifiée, alors des traces de rouille argentée devraient apparaître. Pour plus de détails sur le suivi de population, se référer au protocole qui est disponible en annexe 4.

2.d Analyses statistiques

Les suivis de population réguliers sur la parcelle d'étude ont comme objectif de voir comment évolue la pression démographique d'*E. brevisetis* dans le temps et dans l'espace. Ces comptages vont nous permettre de créer des cartes mettant en avant l'évolution de la pression démographique de l'insecte parasite au cours des semaines (se référer à l'annexe 5). Ces cartes nous permettent de

conclure que la variation temporelle de la population de thrips dans la bananeraie n'est pas statique mais bel et bien dynamique, puisqu'on remarque qu'il y a des endroits où la pression est plus forte pour une semaine donnée, et aussi que ces endroits ainsi que la force de pression évoluent au cours des différentes semaines. Les variables que nous allons essayer d'expliquer sont les suivantes : le nombre de thrips sur le pied mère, le nombre de thrips sur le rejet et la somme des deux, c'est-à-dire le nombre de thrips par situation. En effectuant des tests statistiques nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

Est-ce que le nombre de thrips est fonction du temps, de la croissance des rejets ou de la phénologie des pieds mères (hauteur rejet, jetée, inflorescence) ?

La hauteur du rejet a-t-elle une influence sur le nombre de thrips sur le rejet ? Et sur le nombre de thrips sur le bananier mère ? S'il existe des échanges entre rejet et bananier, comment s'effectue la contamination ? Du rejet vers le pied mère ou du pied mère vers le rejet ? Le nombre de thrips sur le rejet a-t-il une incidence sur le nombre de thrips sur le bananier ?

Les plantes du couvert végétal ont-elles un effet sur le nombre de thrips sur le pied mère et le nombre de thrips sur le rejet ? Est-ce que les 2 plantes adventives où on trouve *E. brevisetis* (*alocasia* et *mikania*) ont eu incidence sur le nombre de thrips par situation ? Et qu'en est-il pour les deux plantes où on ne l'a pas vu (*peperomia* et *cyathula*) ?

L'effeuillage, l'amendement d'engrais ou autres actions culturales ont-ils un effet sur le nombre de thrips sur le pied mère et le nombre de thrips sur le rejet ?

Pour répondre à toutes ces questions statistiques nous utiliserons le logiciel libre R studio ainsi que de nombreux packages (*spatstat*, *gstat*, *splancs*, *lattice*, *ade4*, *spdep*, *vegan*, *lme4* et *gplots*)

Pour comprendre quels sont les facteurs expliquant le mieux la dynamique de population de thrips observée en bananeraie, nous allons construire un modèle GLM (Generalized Linear Model). Nous traiterons séparément le cas du rejet et du bananier mère. Les deux variables à expliquer seront donc le nombre de thrips sur rejet puis le nombre de thrips sur bananier. Les variables explicatives sont choisies de façon à ce qu'il n'y ait pas de redondance. Comme on peut l'observer grâce aux graphiques de l'annexe 6, le type de feuilles des rejets ainsi que le nombre de feuilles dont ils sont composés, sont deux paramètres corrélés à la hauteur des rejets. Donc nous ne retiendrons que la hauteur comme variable explicative afin de ne pas encombrer le modèle inutilement. De plus nous pourrions introduire le facteur quadratique puisqu'on peut remarquer une courbe à tendance exponentielle reliant la hauteur des rejets au nombre de thrips (cf. annexe 7). Dans ce modèle explicatif du nombre de thrips sur rejet nous aurons donc finalement la variable hauteur de rejet, la même variable au carré, les plantes adventives, la proximité avec d'autres rejets étudiés (i.e. vois.lag), le nombre de jours écoulés depuis le début de l'expérimentation, le nombre de thrips du bananier, la pluviométrie, ainsi que la température moyenne de la journée. Quant au modèle explicatif du nombre de thrips sur bananier, une seule variable sera modifiée. Il s'agira de la variable « nombre de thrips sur bananier » qui sera remplacée par « nombre de thrips sur rejet ».

2.e Résultats

→ Pour la variable nombre de thrips sur le rejet

Variables explicatives	Df	Deviance	F value	Pr(>F)	Significativité
Jetée du bananier	1	1921.6	8.97	0.002	**
Proximité d'autres rejets de l'étude	1	1920.8	8.55	0.003	**
Hauteur du rejet	1	3041.6	574.86	$<2.2^{-16}$	***
Nombre de thrips sur bananier mère	1	1917.1	6.70	0.009	**
Nombre de jours écoulés	1	1940.9	18.72	1.7-5	***
Présence alocasia	1	1922.8	9.53	0.002	**
Présence mikania	1	1904.5	0.29	0.589	
Présence peperomia	1	1911.6	3.92	0.047	*
Température	1	1904.5	0.32	0.566	
Précipitation	1	1908.9	2.54	0.110	
Hauteur quadratique du rejet	1	2330.2	215.41	$<2.2^{-16}$	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Au fur et à mesure, nous enlevons les variables explicatives dont la significativité est mauvaise, et nous rentrons un nouveau modèle glm sous R comprenant les mêmes variables que le modèle précédent moins celle expliquant le moins le nombre de thrips du rejet. Dans l'ordre, nous avons enlevés les variables « mikania », « température », « précipitation », « peperomia », « proximités d'autres rejets », « nombre thrips du bananier », « jetée du bananier » et enfin « alocasia ».

Le dernier modèle testé contient donc les variables permettant d'expliquer au mieux le nombre de thrips sur le rejet comme en atteste le tableau suivant :

Variables explicatives	Df	Deviance	F value	Pr(>F)	Significativité
Hauteur du rejet	1	3381	686.76	$<2.2^{-16}$	***
Nombre de jours écoulés	1	2011	14.96	0.0001	***
Hauteur quadratique du rejet	1	2510	259.90	$<2.2^{-16}$	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Les scripts sont disponibles en annexe 8. La loi utilisée est la loi de quasi Poisson, puisque la surdispersion est trop importante pour qu'on puisse dire que les données suivent une loi de Poisson.

→ Pour la variable nombre de thrips sur le bananier

Variables explicatives	Df	Deviance	F value	Pr(>F)	Significativité
Jetée du bananier	1	2593.3	59.71	2.75-14	***
Proximité d'autres rejets de l'étude	1	2535.1	36.74	1.93-9	***
Hauteur du rejet	1	2508.9	26.46	3.25-7	***
Nombre de thrips sur rejet	1	2473.7	12.56	0.0004	***
Nombre de jours écoulés	1	2442.2	0.17	0.675	
Présence alocasia	1	2443.4	0.64	0.422	
Présence mikania	1	2447.7	2.31	0.128	
Présence peperomia	1	2453.7	4.69	0.03	*
Température	1	2442.9	0.43	0.507	
Précipitation	1	2449.2	2.93	0.086	.
Hauteur quadratique du rejet	1	2463.3	8.5	0.003	**

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A première vue, on peut tout de suite remarquer que les variables qui permettront d'expliquer au maximum le nombre de thrips sur le bananier ne vont pas être les mêmes que pour l'étude statistique précédente concernant le nombre de thrips sur rejet. Les variables de la moins explicatives à la plus explicative parmi les variables retirées du modèle ont été les suivantes : nombre de jours écoulés, température moyenne de la journée, alocasia, mikania, précipitations, peperomia, hauteur du rejet au carré, nombre de thrips sur le rejet.

Au final, par rapport au nombre de thrips sur bananier, les variables explicatives les plus significantes sont présentées dans le tableau suivant :

Variables explicatives	Df	Deviance	F value	Pr(>F)	Significativité
Jetée du bananier	1	2751.4	92.11	$<2.2^{-16}$	***
Proximité d'autres bananiers de l'étude	1	2615.7	39.72	4.42^{-10}	***
Hauteur du rejet	1	2793.2	108.25	$<2.2^{-16}$	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Les scripts ayant permis d'aboutir à ce résultat sont disponibles en annexe 8.

2.f Discussion et conclusion

Dans les deux études statistiques que nous venons de mener, une variable explicative commune est présente. Il s'agit de la hauteur du rejet. Tout simplement pour la variable nombre de thrips sur le rejet, plus la hauteur du rejet est importante plus sa surface foliaire est grande et plus il y a de place pour accueillir des thrips. Cela explique donc que le nombre de thrips sur rejet soient croissants au cours des relevés de terrain, car les rejets n'ont cessé de grandir. Pour le nombre de thrips sur bananier, cela signifie que plus il y a de thrips sur le rejet, et plus il y en a sur le bananier, ce qui induirait un déplacement préférentiel des thrips depuis les rejets sur les plantes mères.

Les deux autres variables expliquant le mieux le nombre de thrips sur rejet sont liées à la hauteur. Pour la hauteur au carré c'est une évidence. Pour le nombre de jours écoulés aussi, puisque les rejets se sont développés au cours du temps. Ils ont grandi et ont produit un nombre de feuille plus important au fil du suivi. Nous pouvons aussi considérer le facteur « présence d'alocasia » qui était encore présent à l'avant dernier modèle glm avec une significativité scientifique avérée (***). Ce qui signifie que la plante adventice *Alocasia* peut servir de plante hôte à *E.brevisetis* et que par la suite celui-ci peut se propager et affecter d'autres plantes alentours comme c'est le cas du bananier *Musa Cavendish* et particulièrement des rejets. En effet, étant de petites tailles, les feuilles de rejet se retrouvent parfois en contact direct avec les plantes adventices *Alocasia* pouvant mesurer plus d'un mètre.

Les deux autres variables explicatives du nombre de thrips sur bananier sont d'une part le stade phénologique de jetée des bananiers soit quand le régime portant les fleurs puis les bananes apparaît au sommet du bananier, et d'autre part la proximité d'autres bananiers de l'étude. La première tendrait à nous faire croire que des molécules pourraient être produites par le régime au cours de la jetée qui feraient fuir les thrips des feuilles de bananiers mères. Sur les régimes non engainés, nous pouvons trouver de nombreux thrips sur les fruits en croissance. Sur les régimes engainés en revanche, il est arrivé parfois de rencontrer un thrips qui avait réussi à franchir la barrière de la gaine, mais très rarement. Dans ces deux cas de figure, moins de thrips ont été observés sur les feuilles de bananiers, mais on n'explique pas où se retrouvent ceux des bananiers dont les régimes sont sous gaine plastique. Les bananiers adultes ont des grandes feuilles, qui par conséquent se touchent, ce qui facilite très nettement le déplacement d'*E.brevisetis*, incapable de se servir de ces ailes pour voler. C'est pourquoi la présence d'autres bananiers de l'étude à proximité est un facteur de corrélation significatif. Deux bananiers étant proches spatialement auront un nombre moyen de thrips suffisamment proches pour affirmer que la proximité des bananiers entre eux a une place importante dans l'explication du nombre de thrips sur bananier.

3) L'ETUDE DU CYCLE DE VIE

Le cycle de vie, à peu de chose près analogue à tous les thysanoptères, dépend essentiellement des facteurs environnementaux comme la température ou bien l'hygrométrie. Il se compose toujours de 4 stades. Généralement, les œufs sont insérés dans les tissus foliaires ou bien le péricarpe des fruits qui se transforment rapidement en larves qui deviennent nymphes avant d'atteindre le stade ultime, le stade imago (adulte). Ces différentes phases ont des caractéristiques temporelles et physiologiques parfois bien différenciées entre les espèces de thrips. C'est la raison pour laquelle l'étude du cycle de vie d'*E. brevisetis*, espèce assez méconnue, semblait être incontournable.

3.a L'élevage de thrips et les méthodes employées

Contrairement aux élevages de thrips rencontrés dans la littérature scientifique, l'élevage envisagé sera des plus basiques. Les thrips prélevés sur une bananeraie attenante à la parcelle « fruit à pain » sur l'exploitation Fijo, seront placés sur des plantes adventives largement rencontrées sur le terrain ainsi que sur vitroplant de bananier évidemment. La description de chacune de ces plantes ainsi que le protocole d'élevage sont disponibles en annexes 9 et 10. Aucun autre complément, par exemple alimentaire (sucre, miel...), n'a été envisagé. Nous espérons obtenir un développement de l'espèce avec le plus simple matériel possible, le matériel végétal uniquement. Les plantes, en pot, ont été placées dans des cages transparentes en PVC fermées. Aussi, du drap blanc a été déposé pour recouvrir le socle de la cage ainsi que le pot afin de pouvoir voir les thrips tombés de la plante ou essayant de s'échapper, ou bien de voir les pupes (équivalent du stade nymphe), qui à l'état sauvage se trouvent au sol, au pied de la plante hôte. Les plantes ont été arrosées trois fois par semaine.

En parallèle un autre dispositif d'élevage a été mis en place, celui-ci consistant à maintenir les thrips prisonniers dans des minicups (cage cylindrique de quelques centimètres de diamètres) disposées sur les limbes des adventices ou vitroplants de bananier. De cette façon, nous pouvons espérer observer sur la surface circulaire du limbe où les thrips ont été contenus des marques provenant soit d'une prise alimentaire soit d'oviposition par exemple.

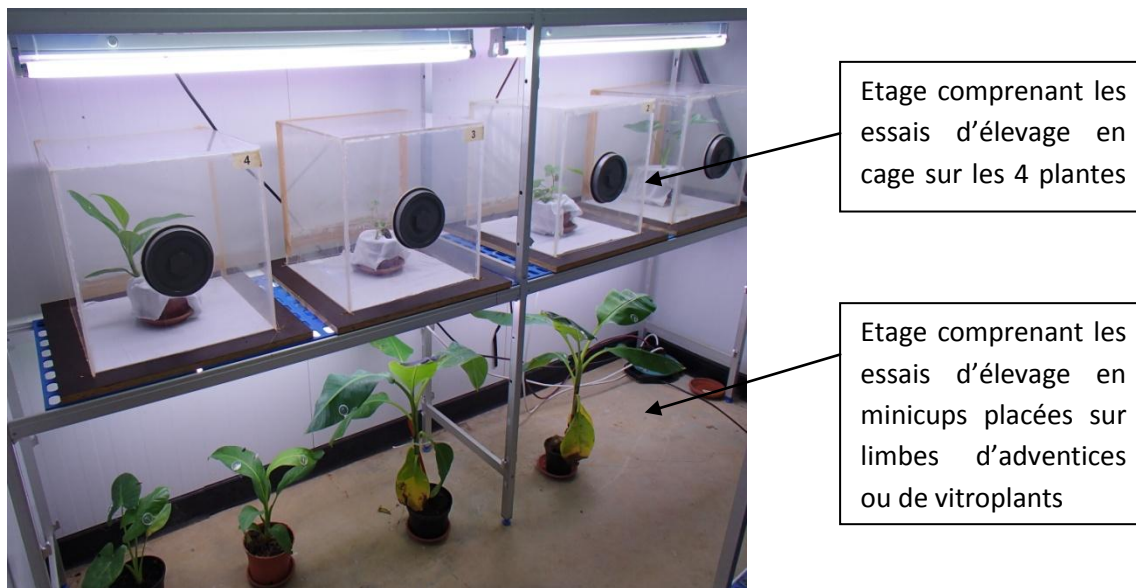


Figure 7. Photographie des essais d'élevage en chambre climatique

3.b Résultats des essais d'élevage

Après l'installation des équipements nécessaires pour remplir les conditions convenant à l'élevage de thrips, nous avons enfin pu démarrer les essais qui vont durer pendant deux mois et demi. Sur toute cette période, nous avons seulement réussi à avoir quelques larves, sans avoir l'occasion d'observer une seule pupa, ni sur les plantes ni sur le socle clair des cages. A chaque tentative, la plupart des individus disparaissaient très rapidement. Sur les 6 essais entrepris, on ne retrouve plus de thrips vivants sur *Mikania micrantha* seulement un jour après y avoir déposé les 20 individus, et deux jours pour *Diffenbachia seguine*. Les adventices sur lesquelles les thrips survivent le plus longtemps sont *Peperomia pellucida* et *Alocasia macrorrhiza*. Chez qui on observe des thrips encore vivants respectivement 5 jours et 6 jours après le début des essais. Malgré la mauvaise prise des élevages, ci-dessous se trouve le cycle de vie d'*E. brevisetis*, échafaudé à partir de recherches bibliographiques portant notamment sur son proche parent, mieux connu, il s'agit bien évidemment d'*H. femoralis*.

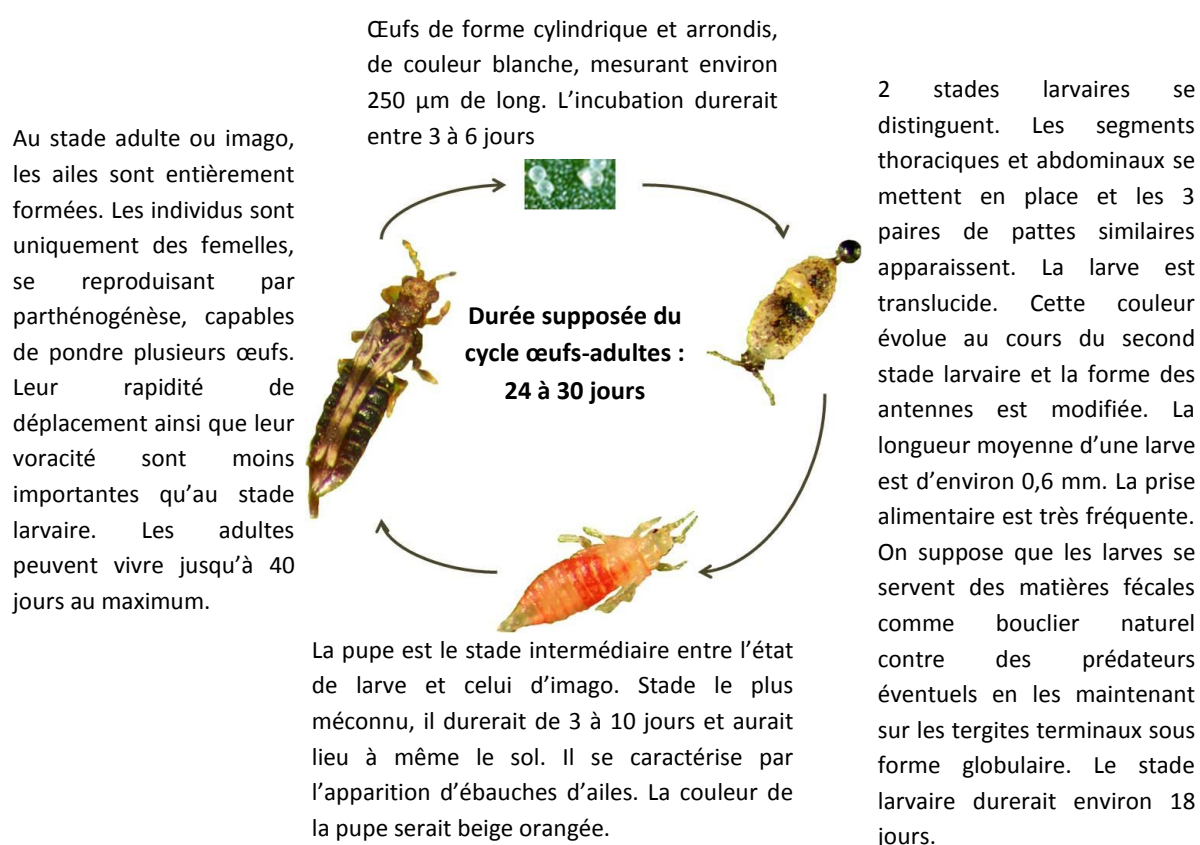
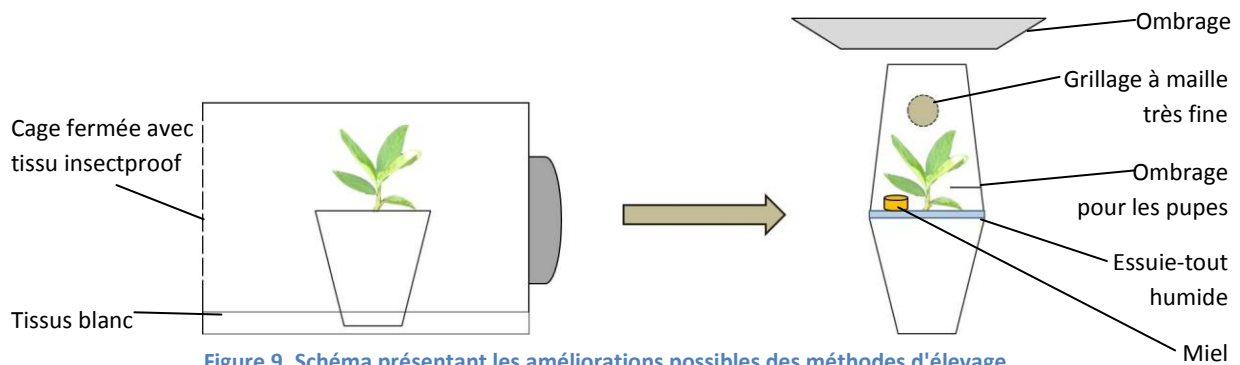


Figure 8. Schéma présentant les différents stades du cycle de vie d'*E. brevisetis*

3.c Proposition d'améliorations des méthodes d'élevage

La première amélioration indispensable porterait sur l'hygrométrie, insuffisamment élevée lors de nos essais. Au lieu de 70% d'humidité relative effective pour la réalisation d'une expérimentation dans la même chambre climatique, il vaudrait mieux envisager 85%, correspondant plus à la réalité de l'environnement d'où proviennent ces thrips.

De plus à la place d'une cage, très volumineuse, il serait certainement plus appréciable d'avoir un contenant placé sur le pot et ayant la capacité de contenir la plante entièrement sans empêcher sa survie (cf. figure ci-dessous). Aussi il faudrait envisager l'ajout de complément alimentaire comme du miel, et privilégier un tissu humide pour recouvrir la partie basse de la plante, comme de l'essuie-tout. En effet cela serait probablement plus favorable pour passer du stade pupe au stade adulte. Enfin on pourrait essayer d'apporter un peu plus d'ombre, la luminosité étant peut-être trop forte, à l'aide d'un tissu, à la fois pour les individus vivants sur la plante comme pour ceux au stade de pupe se trouvant au sol.



4) LE PRINCIPE NOVATEUR DU BARCODING

Depuis le début du troisième millénaire, des progrès technologiques très importants ont été fait en matière de recherche en biologie moléculaire. Auparavant seulement quelques molécules d'ADN, plutôt de petite tailles, avaient été séquencées, comme par exemple le génome d'*Arabidopsis thaliana*, celui de la drosophile ou encore les génomes de certains virus. Après bon nombre de découvertes scientifiques, la technique du barcoding moléculaire a enfin émergé.

4.a Le barcode : un outil d'identification trophique et taxonomique

Le « barcode de l'ADN » est une technique standardisée permettant l'identification d'une espèce grâce au séquençage d'une courte région d'ADN, appelée barcode moléculaire, à partir d'un échantillon biologique. Ce fragment d'ADN est présent chez tous les organismes vivants. Il s'agit de la région d'ADN du génome mitochondrial codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (COI). Ce gène présente un niveau de variabilité intéressant : les différences entre les séquences de ce gène chez différents individus, apparues par mutation au cours du temps, sont faibles entre les individus d'une même espèce et élevées entre des individus d'espèces différentes. C'est ainsi que cette séquence d'ADN peut être utilisée, à l'instar des codes-barres du commerce, comme un outil d'identification taxonomiques des organismes vivants. Pour cela, il faut d'abord mettre au point un catalogue de biodiversité génétique des êtres vivants en utilisant cette technique de barcoding et en créant une base de données regroupant les résultats des séquençages. C'est ce que propose le projet BOLD (Barcoding Of Life Database), créé en 2003, et qui en septembre 2012 ne regroupait pas moins de 120000 espèces pour 1,7 millions de séquences recensées. Le « barcode de l'ADN » permet

d'identifier ensuite des fragments (corps entier ou partiel) de tissus provenant d'organismes vivants dont la morphologie ne permet pas d'identification visuelle. Par exemple cette technique permet d'identifier des animaux marins échoués dont l'espèce ne peut pas être reconnue visuellement, ou bien des restes de proie trouvés dans le système digestif d'un animal ou encore la provenance animal du cuir d'un sac à main...

4.b Séquençage des thrips rencontrés

Dans le cadre de notre étude, il s'agira de référencer la base de données, c'est-à-dire de l'enrichir en ajoutant les barcodes des espèces de thrips présentes sur la bananeraie de l'exploitation Fijo, à la fois sur les bananiers comme sur la flore adventive. Une fois les séquences du gène COI récupérées pour chacune de ces espèces, nous pourrions les comparer et ainsi observer les liens phylogénétiques existants. Par ailleurs on pourra s'en servir pour analyser les contenus stomacaux d'autres insectes (fourmis ou thrips prédateur *F. vespiformis*) pour savoir par exemple s'ils peuvent être utilisés en lutte biologique en tant que prédateur contre *E. brevisetis* pour limiter les désagréments qu'il est susceptible d'engendrer.

Pour obtenir la séquence du gène COI des thrips, de nombreuses étapes sont nécessaires. La première consiste à extraire l'ADN des insectes. La seconde, qui a révolutionné la recherche moléculaire, est la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui consiste à amplifier le gène étudié (explications annexe 11). La troisième comprend la fabrication d'un gel d'agarose que l'on va utiliser pour faire migrer les séquences de gènes amplifiés : ce processus est appelé électrophorèse. Enfin, après avoir vérifié à la lampe UV que l'ADN avait été correctement extrait, amplifié, et que la migration sur gel était bonne, la dernière étape a lieu. Il s'agit de récupérer l'ADN ayant migré sur le gel, en faisant attention de récupérer séparément les ADN correspondants aux différents individus utilisés sur une même électrophorèse et de les envoyer dans des laboratoires spécialisés dans le séquençage de l'ADN. Toutes ces étapes sont détaillées en annexe 12 sous formes de protocoles.

Les 4 tentatives de production en très grand nombre de gènes COI des thrips rencontrés en bananeraie ont échouées. En effet, la révélation aux UV des électrophorèses ne se sont pas montrées probantes. Parfois la migration n'apparaît pas ou trop peu pour affirmer que la PCR ait bien fonctionné. Et sur un autre gel, le témoin est marqué alors que pour certaines PCR d'insectes, l'ADN n'est pas du tout révélé aux UV (cf. annexe 13). Ces travaux moléculaires n'ont donc pas pu être exploités et n'ont donc pas été envoyés dans des laboratoires de pyroséquençage.

4.c Propositions d'amélioration de protocole

Après avoir réfléchi sur les causes de ces échecs à répétition sur mon travail de biologie moléculaire, il semblerait qu'elles proviennent de la 1^{ère} étape, c'est-à-dire l'extraction de l'ADN. Ce qui suit est le protocole d'extraction revisité (cf. site internet dnalc.org -> onglet ressources -> onglet animations et sélection de DNA barcoding) :

1. Placer le ou les insecte(s) dans un microtube de centrifugation 1.5ml contenant 160 µl d'eau distillée. Ecraser les thrips avec un micropilon dans le tube. Ajouter 20 µl de protéinase K et homogénéiser. Homogénéiser au vortex et incubé plusieurs heures à 65°C.
La protéinase K digère les cellules et permet d'extraire les acides nucléiques. La lyse est complète en 1-3 h. Peut durer toute la nuit.
2. Centrifuger à 6000g (8000rpm, rotations par minute) pendant 1 min et récupérer le surnageant où se trouve l'ADN en solution. Y ajouter quelques µl d'isopropanol. Vortexer.
L'isopropanol est un alcool à la force ionique puissante qui va se complexer avec les molécules nucléiques.
3. Centrifuger à 8000 rpm. Enlever le surnageant et conserver le tube comprenant le culot (correspondant au précipité isopropanol/ADN). Ajouter de l'éthanol et centrifuger à nouveau à 8000 rpm.
L'éthanol va avoir une action de nettoyant et de purifiant.
4. Enlever le surnageant et laisser le culot s'assécher 10 minutes. Puis ajouter de l'eau osmosée pour réhydrater l'ADN. Laisser agir 12 heures environ.

En suivant ces 4 étapes, nous obtenons alors uniquement de l'ADN en solution, qui est purifié. On va pouvoir s'en servir ensuite pour passer à l'étape de PCR en y ajoutant une solution MIX comprenant la Taq polymérase et les désoxyribonucléotides ainsi que des primers compatibles avec le gène ciblé, le gène COI.

Une fois les barcodes de thrips séquencés, il serait intéressant de faire le même travail concernant les plantes présentes en bananeraie. Le gène utilisé dans le règne végétal provient de l'ADN chlorophyllien et code pour la grande sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase (RuBisCO), l'enzyme de la photosynthèse, autrement appelé gène *rbcL*. Comme pour le règne animal, cette séquence du génome a un taux d'évolution assez lent et permet donc de retracer l'évolution des grandes familles de plantes via des reconstructions phylogénétiques. Mais pour notre étude des thysanoptères, il aurait comme but ultime de rechercher dans les intestins les espèces végétales ingérées par les différentes espèces de thrips. Ainsi, nous pourrions aboutir pourquoi pas à une hiérarchisation des plantes en bananeraie les plus appréciées par chaque espèce de thrips et donc cibler lesquelles sont potentiellement les plus préjudiciables pour la culture bananière.

CONCLUSION

Les trois composantes ambitieuses de ce stage, l'élevage, la biologie moléculaire et le suivi de population du thysanoptère *E. brevisetis* n'auront pas toutes pu être concluantes. Néanmoins, le suivi démographique en bananeraie aura abouti à plusieurs résultats scientifiques intéressants permettant de déterminer les facteurs principaux expliquant la dynamique de variations de population. L'hypothèse la plus vraisemblable statistiquement pourrait se résumer en 3 étapes. La première serait le déplacement des thrips depuis les feuilles d'*Alocasia*, adventice hôte présente au sol, jusqu'aux feuilles de rejets. Puis la deuxième étape serait une transition du rejet jusqu'aux feuilles de bananiers mères entre lesquels existeraient des échanges directs de thrips. Enfin la troisième étape aurait lieu à l'apparition du régime, quand le bananier « jette ». Cette variation du nombre de thrips serait causée par la production de molécules particulières par le régime lors de la jetée qui sembleraient attirer les thrips sur les fruits lorsque ceux-ci ne sont pas protégés par une gaine. Malheureusement, le stade biologique des bananiers de la parcelle sélectionnée n'a pas pu être évalué avec précision, et le premier mois d'étude, sans jetée et comprenant des rejets très petits, n'était pas nécessaire. Nous commençons à avoir des résultats très intéressants entre les bananiers avec régimes entre ceux gainés et ceux non gainés, avec de fortes disparités par rapport au nombre de thrips sur le régime. Si l'étude continue pendant encore trois mois jusqu'à la récolte des régimes des bananiers de l'expérimentation, alors il sera intéressant de traiter les données relatives au régime. Peut-être pourrions-nous enfin prouver qu'*E. brevisetis* est le véritable responsable de la rouille argentée et quantifier son degré de nocivité grâce à des traitements statistiques permettant de chiffrer les pertes économiques engendrées pour l'exploitation?

ANNEXES

Annexe 1

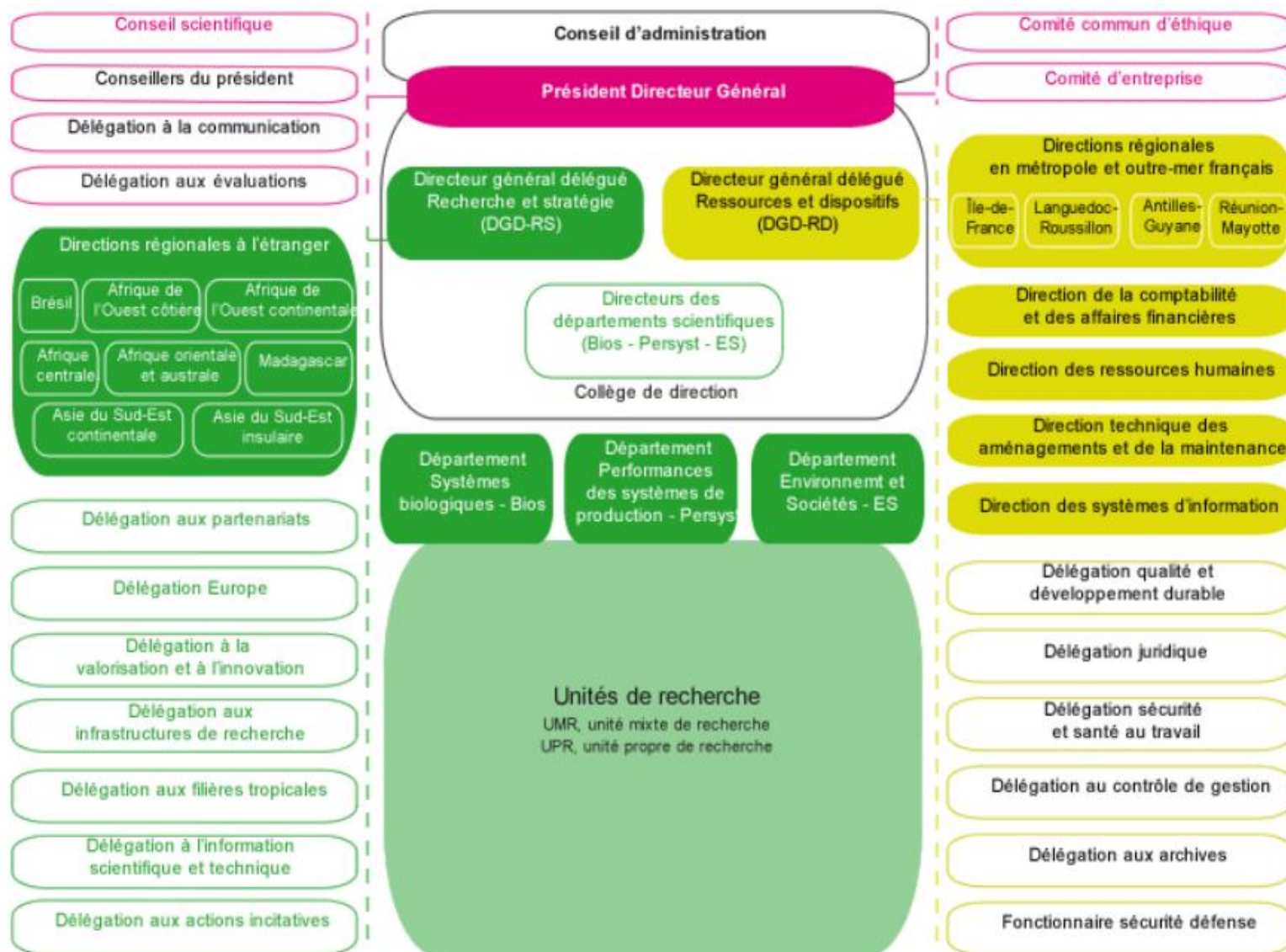


Figure 10. Organigramme général du CIRAD

Annexe 2

ORDRE

SOUS-ORDRE

FAMILLE

SOUS-FAMILLE

GENRE OU ESPÈCE

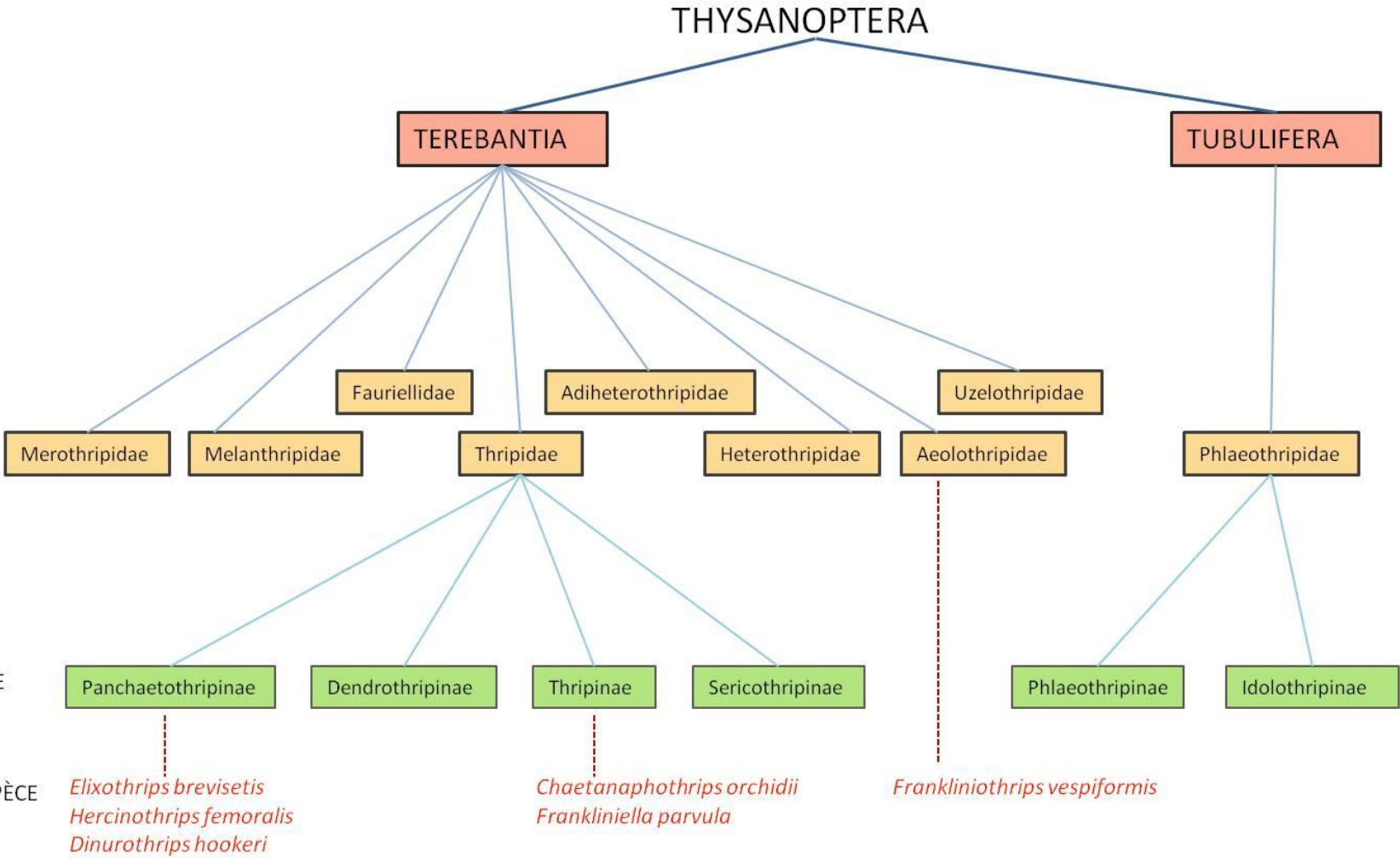


Figure 11. Arbre phylogénétique de l'ordre des thysanoptères

Annexe 3

N° Id.	Heure	Nb F rejet	Hauteur rejet	Type F rejet	Nb thrips rejet	Nb thrips plant mère	Nb thrips inflo.	Nb thrips fruits	Nb thrips hampe	Observations comportement (oviposition, présence larves, s'alimentant...)	Présence d'autres espèces de thrips (nom et nombre sur chaque zone de suivi et comportement...)	Autre commentaire (lianes sur pseudo-tronc, averse...)

Date :

Météo :

Tableau 2. Fiche de relevés de terrain

Annexe 4 Protocole de suivi de population et d'observation comportementale des thrips sur une des parcelles de l'exploitation Fijo

MATERIEL

- Echelle
- Loupe de terrain
- Feuilles d'observation + crayons
- Glacière avec équipements habituels (pinceau, tubes vides, avec solution alcoolisée, boîtes...)

METHODE

Parcelles : la parcelle suivie sera en 2^{ème} cycle, la jetée n'étant pas encore initiée et présentant des rejets mesurant entre 0,5 et 1 m environ. L'âge de la parcelle a été choisi pour obtenir une légère asynchronie dans le stade de développement des plants.

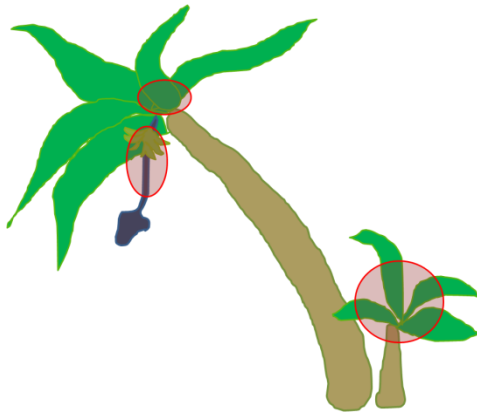
Suivi : Sur la parcelle suivie, une zone de bananiers est définie. La parcelle est trop petite pour pouvoir choisir uniquement des bananiers se trouvant au centre de la parcelle, c'est pourquoi nous devons prendre en compte un effet bordure/lisière. La zone échantillonnée comprendra X rangs et Y lignes de bananiers, où seront choisis 30 bananiers aléatoirement. La moitié d'entre eux sera engainée, l'autre moitié ne le sera pas. Les bananiers seront identifiés grâce à des panneaux/plaques plantés à leur côté portant un numéro propre à chacun d'entre eux.



Figure 12. Ebauche d'un plan d'échantillonnage fictif de la parcelle

 bananier  engainé  non gainé

Les sorties terrain sur la parcelle auront lieu trois matinées par semaine (lundi, mercredi et vendredi), pour observer les thrips et leurs évolutions démographiques. Après le développement de l'initiation florale en réelle inflorescence, ou jetée, il faudra effectuer des observations précises jusqu'à ce que la fructification soit terminée et les fruits récoltés.



Pour vérifier l'hypothèse que c'est bien *Elixothrips brevisetis* le responsable de la rouille argentée, nous allons suivre les déplacements de thrips sur 30 bananiers sur les trois zones entourées en rouge sur le schéma ci-contre. Il s'agira au cours des semaines avant jetée des feuilles du bananier mère et du rejet. Ensuite, une fois l'inflorescence démarrée, on regardera aussi la présence ou l'absence de thrips au niveau des fleurs puis des jeunes fruits, que le régime soit engainé ou non. Si d'autres thrips qu'*E. brevisetis* ou *F. parvula* sont présents, il faudra l'identifier et assurer également le suivi de sa population.

Figure 13. Schéma pour visualiser les zones clés à observer

Les bananiers seront suivis dans un ordre différent chaque semaine afin d'éviter un effet temps/heure de la journée.

Pour chaque bananier, il faudra noter les caractéristiques suivantes :

- Type de feuilles du rejet (lancéolée ou non)
- Nombre de feuilles du rejet
- Stade phénologique du pied mère
- Présence de lianes ou non sur le pseudotrunc

En procédant de cette façon, nous pourrions mettre en évidence si oui ou non *brevisetis* cause la rouille argentée, et comment exactement. En observant ses déplacements au niveau des différents spots mentionnés précédemment, nous pourrions en apprendre plus sur le comportement et le cycle de vie que le thysanoptère mène en liberté dans une bananeraie. Parallèlement à ces observations visuelles, des relevés seront effectués pour évaluer sur le long terme la dynamique de population. Pour plus de détails, se référer à la fiche de suivi présente ci-dessus.

Hypothèses émises :

- *Elixothrips brevisetis* est responsable de la rouille argentée des bananes occasionnée par la piqûre des jeunes fruits ou fleurs par succion du contenu cellulaire.
- Les attaques ont lieu plusieurs jours avant la fructification d'après les résultats d'une étude récente, c'est pourquoi il sera nécessaire de suivre avec vigilance le comportement des thrips dès l'apparition du régime, donc à la jetée, et notamment au moment de l'apparition des fleurs.

Annexe 5 : Cartes de pressions du thrips pour différentes semaines de l'expérimentation et script R

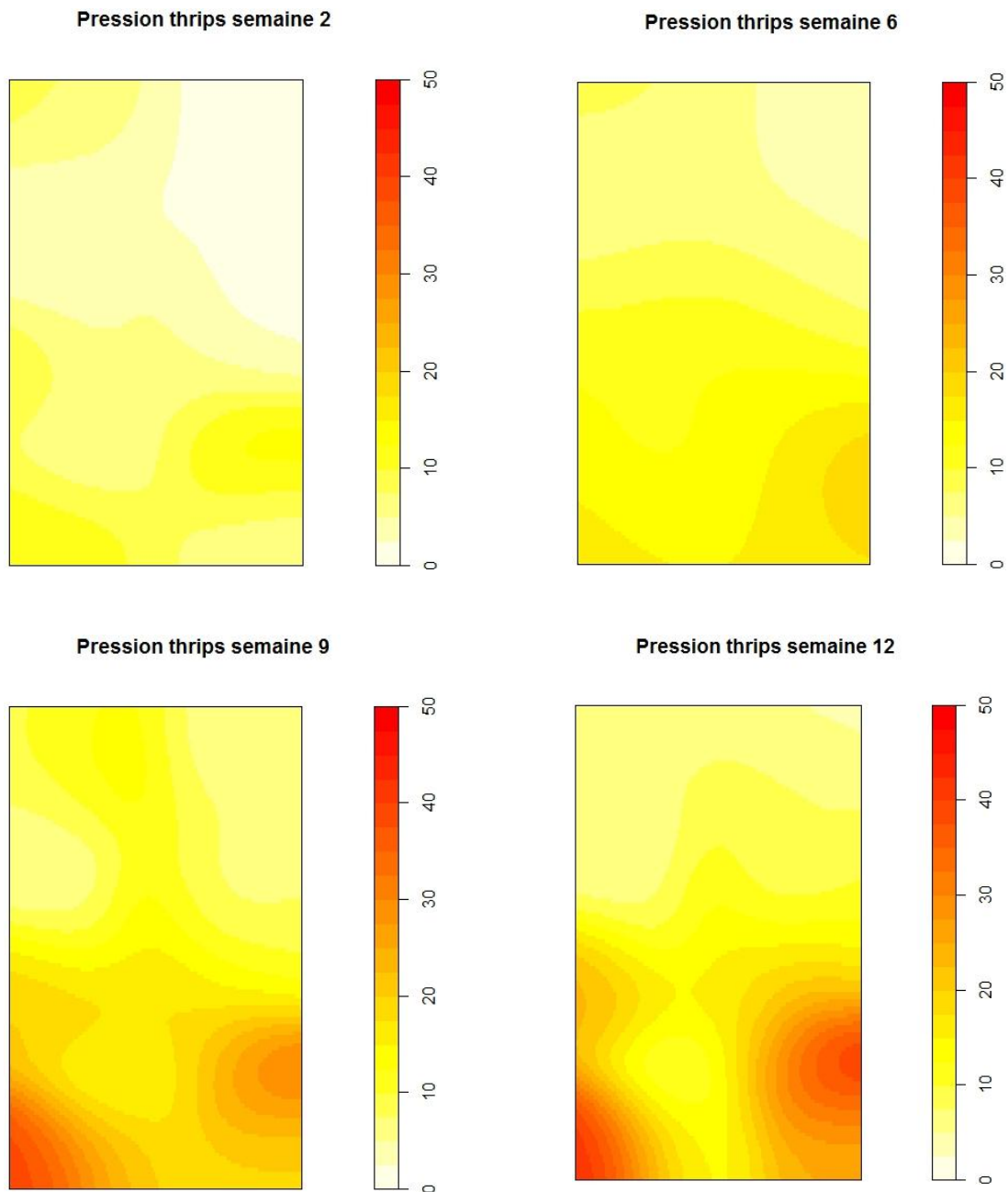


Figure 14. Cartes de pressions du ravageur à différentes semaines de l'expérimentation

```
moysemsit<-read.table("moysemsit.csv",sep=";",header=TRUE)
subsit<-subset(moysemsit,moysemsit$semaine=="1")
maxX<-max(subsit$x)
maxY<-max(subsit$y)
parcalle<-owin(c(-20,maxX+20),c(-20,maxY+20))
datasem1<-as.data.frame(cbind(subsit$x,subsit$y,subsit$nb_thrips_rejet
datasem1ppp<-as.ppp(datasem1,W=parcalle,marks=c("nb_thrips_rejet"))
Listcolor<-heat.colors(20)[20 :1]
plot(smooth.ppp(datasem1ppp,hmax=85, warn=TRUE),col=listcolor,zlim=c(0,50), main="Pression
+ thrips semaine 1")
```

Annexe 6: Graphiques expliquant le lien entre hauteur, type et nombre de feuilles des rejets

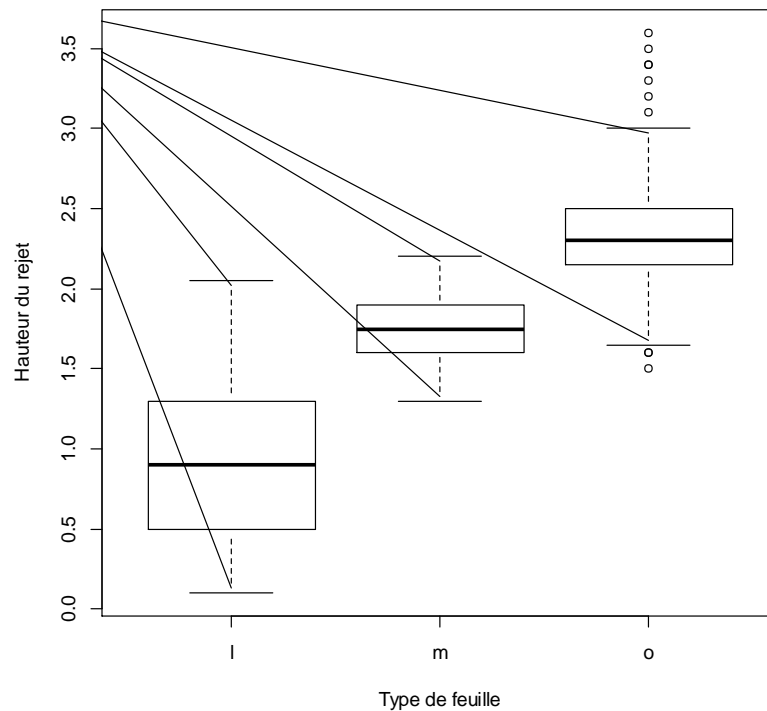


Figure 15. Boîte à moustache du type de feuille en fonction de la hauteur du rejet

```
boxplot(hauteur_rejet~type_f_rejet, data = dfrejet, xlab="Type de feuille", ylab="Hauteur du rejet")
```

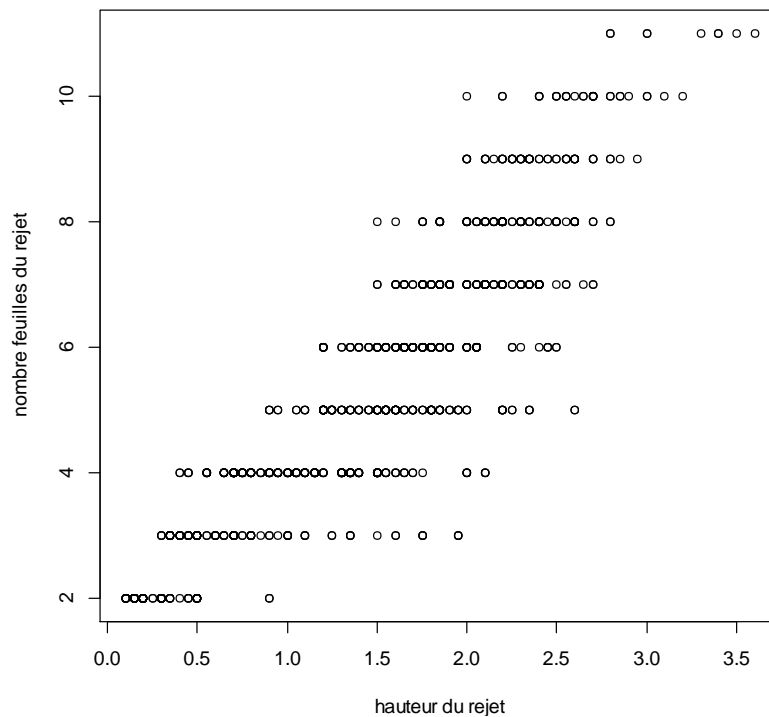


Figure 16. Graphique présentant la hauteur du rejet en fonction du nombre de feuilles le composant

```
plot(nb_f_rejet~hauteur_rejet,data=dfrejet, xlab="hauteur du rejet", ylab="nombre feuilles du  
rejet")
```


Annexe 7 : Hauteur du rejet en fonction du nombre de thrips s'y trouvant pour chaque relevé effectué

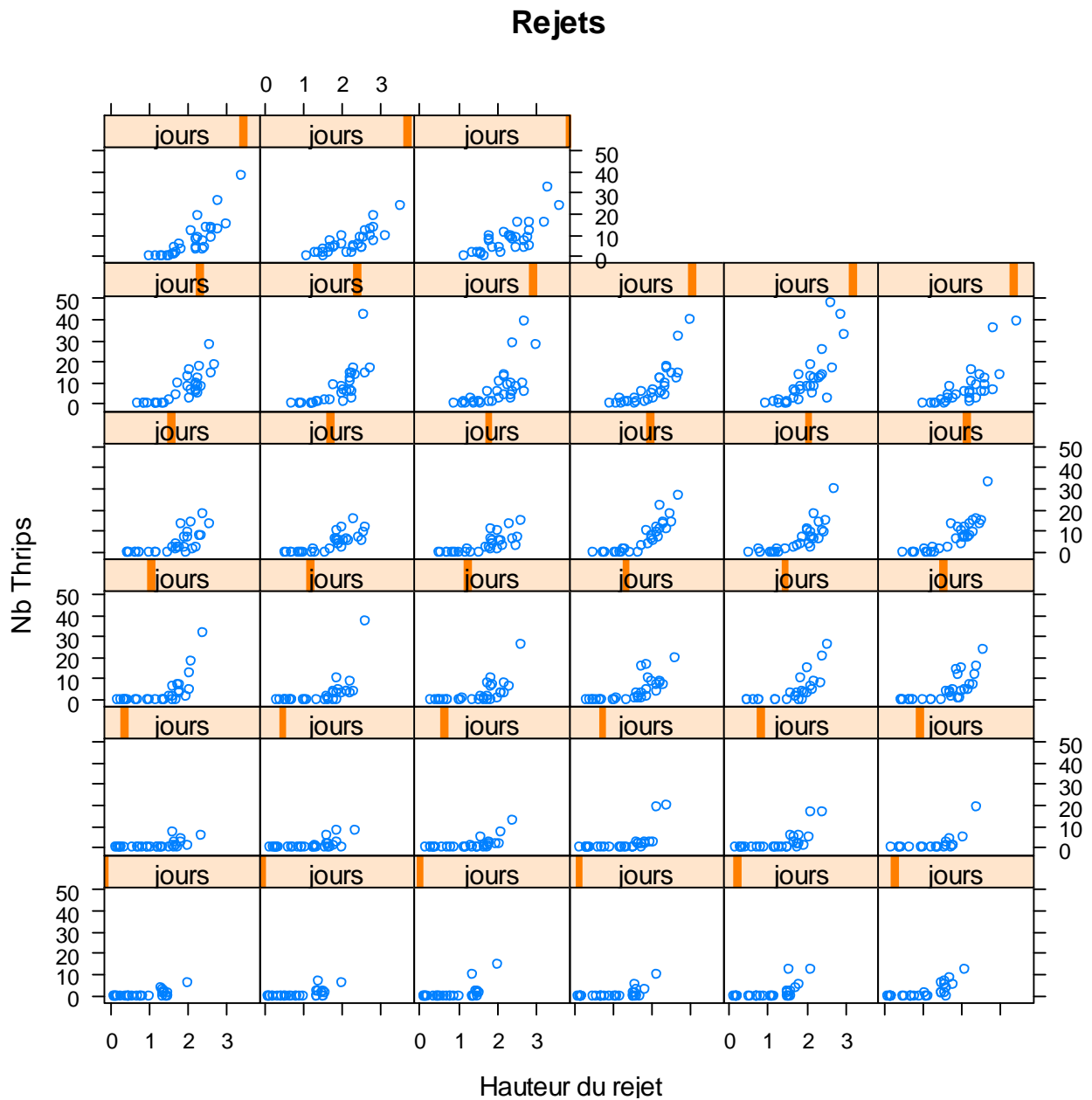


Figure 17. Graphiques montrant un lien exponentielle entre le nombre de thrips du rejet et la hauteur du rejet

```
xyplot(nb_thrips_rejet~hauteur_rejet|jours, data = dfrejet, main="Rejets", xlab="Hauteur du rejet",
ylab="Nb Thrips")
```

Annexe 8 : Script statistiques des modèles glm pour le nombre de thrips sur rejet et nombre de thrips sur le bananier

```
>M0<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_bananier + jours + alocasia + mikania + peperomia + temperature + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M0,test="F")
```

```
>M1<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_bananier + jours + alocasia + peperomia + temperature + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M1,test="F")
```

```
>M2<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_bananier + jours + alocasia + peperomia + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M2,test="F")
```

```
>M3<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_bananier + jours + alocasia + peperomia + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M3,test="F")
```

```
>M4<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_bananier + jours + alocasia + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M4,test="F")
```

```
>M5<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + hauteur_rejet + nb_thrips_bananier + jours + alocasia + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M5,test="F")
```

```
>M6<-glm(nb_thrips_rejet~ jetee + hauteur_rejet + jours + alocasia + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M6,test="F")
```

```
>M7<-glm(nb_thrips_rejet~ hauteur_rejet + jours + alocasia + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M7, test="F")
```

```
>M8<-glm(nb_thrips_rejet~ hauteur_rejet + jours + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
```

```
>drop1(M8,test="F")
```

```
>M0<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + jours + alocaasia +
>mikania + peperomia + temperature + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = poisson)
>surdispersion<-M0$deviance/M0$df.residual
>surdispersion
# la surdispersion étant supérieure à 1,5, nous devons donc utiliser une loi de quasi poisson, ce que
nous spécifions alors dans le modèle.
```

```
>M0<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + jours + alocaasia +
mikania + peperomia + temperature + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family =
quasipoisson)
>drop1(M0,test="F")
```

```
>M1<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + alocaasia +
mikania + peperomia + temperature + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family =
quasipoisson)
>drop1(M1,test="F")
```

```
>M2<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + alocaasia +
mikania + peperomia + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
>drop1(M2,test="F")
```

```
>M3<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + mikania +
peperomia + pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
>drop1(M3,test="F")
```

```
>M4<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + peperomia +
pluie + I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
>drop1(M4,test="F")
```

```
>M5<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet + peperomia +
I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
>drop1(M5,test="F")
```

```
>M6<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet +
I(hauteur_rejet^2), data = donnees, family = quasipoisson)
>drop1(M6,test="F")
```

```
>M7<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet + nb_thrips_rejet, data = donnees,
family = quasipoisson)
>drop1(M7,test="F")
```

```
>M8<-glm(nb_thrips_bananier~ jetee + vois.lag + hauteur_rejet, data = donnees, family =
quasipoisson)
>drop1(M8,test="F")
```

Annexe 9 Protocole d'élevage de thrips

Objectifs de l'expérimentation :

- Tester en cage les 4 plantes adventices principales sur lesquelles ont été trouvées des *E. brevisetis* pour dégager leur potentialité d'hôte du thysanoptère
- Tester en minicup le développement du thrips sur bananier essentiellement pour pouvoir caractériser les différents stades de développement

Matériel :

- Une chambre climatique
- 4 cages
- Minicups de tailles variables
- Lampes horticoles
- Programmeur
- Terreau
- Matériel végétal sélectionné (vitroplants de bananiers, adventices et plantes de couverture)
- Trombones
- Loupe binoculaire
- Microscope
- Matériel photographique adaptable sur microscope
- Pinceaux, pinces fines, ciseaux, feuilles blanches, crayons (pour faire croquis ou schémas)
- 20 thrips par essais en cage, et 5 par essais en minicup

Méthode :

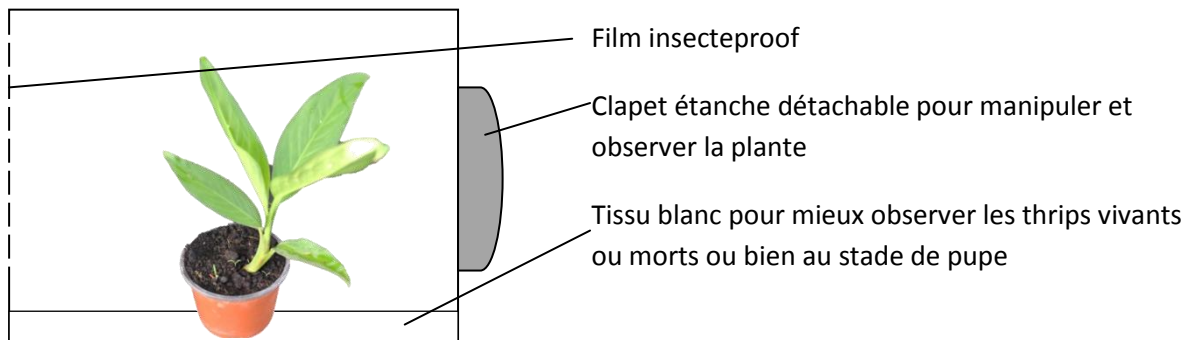
Dans un premier temps, il faut que les conditions climatiques à l'intérieur de la salle d'expérimentation soit les plus ressemblantes que possible à celles existantes sur le lieu où ont été prélevés les thrips. Sauf que le seul emplacement disponible se trouve dans une chambre climatique où une expérimentation antérieure est déjà en cours. La température qui y règne est de 25°C, ce qui convient, mais l'hygrométrie imposée est de 70% alors que nous aurions préféré qu'elle soit de 85%.

En premier seront testées les plantes adventives. Les 4 plantes adventives sélectionnées sur la parcelle où sera effectué le suivi de population de thrips sont les suivantes :

- Alocasia macrorrhiza*
- Peperomia pellucida*
- Mikania micrantha*
- Diffenbachia seguine*

L'objectif est double. Le premier est de voir si certaines parmi ces 4 plantes sont plus propices que d'autres au développement du thysanoptère dans son intégralité, en d'autres termes que le thrips est capable de passer par tous les stades de croissance sur une seule et même adventice. Puis si cette première condition est remplie, alors nous pourrions envisager la constitution d'un pool d'*E. brevisetis* dans lequel on pourrait se servir pour mettre en place d'autres expériences comme l'observation précise du cycle de vie.

Schéma d'une cage d'élevage :



En parallèle des élevages à une échelle spatiale encore plus réduites seront réalisés via l'utilisation de minicups en plastique. Le principe serait de mettre plusieurs individus durant quelques heures dans ces espaces confinés placés sur les feuilles entre le bord du limbe et la nervure centrale. L'objectif serait qu'au moins un des individus ait pondu, par parthénogénèse semblerait-il, pour qu'ensuite on puisse observer le développement des œufs, larves puis nymphes et caractériser ces stades. Pour répondre à cette attente, il faudra bien sûr avoir à disposition un microscope et avoir un nombre suffisant d'échantillons pour pouvoir faire des prélèvements de limbes parasités par *E. brevisetis*.

Annexe 10 Les plantes hôtes potentielles du thrips *Elixothrips brevisetis*

Musa paradisiaca

Nom vernaculaire : Bananier, fruit comestible.

Famille : MUSACEAE



Figure 18. Photographie d'un vitroplant de bananier

Hauteur jusqu'à 8 mètres, pseudo-tronc téréte, Ø 12-30 cm à la base, feuilles de longueurs comprises entre 1,5 et 2,5m et de largeurs allant de 30 à 70 cm, de forme oblongue et de couleur vert clair.

Inflorescence de 1,5 m maximum qui se transforme en régime donnant des fruits de 5-40 cm de L pour 1,5-6 cm de Ø, de forme incurvée, souvent jaune à maturité contenant une pulpe blanche à jaunâtre.

Cultivars : au moins 300 variétés diploïdes ou haploïdes dans le monde.

M. paradisiaca est le point central qui est à la base de ma thématique de recherche. C'est parce qu'*Elixothrips brevisetis* cause des pertes de rendement de bananes préjudiciables pour les producteurs que le projet d'élevage et de suivi de son cycle de vie est mis en place. Mais après plusieurs sorties terrains, les recherches sur rejet de bananier n'ont pas donné de résultats de présence thrips.

Peperomia pellucida

Famille : PIPERACEAE

Altitude 0-800 m



Figure 19. Photographie de l'adventice *Peperomia pellucida*

Plante florissant toute l'année, rudérale et arvale.

Petite herbe terrestre avec une H jusqu'à 40 cm, succulente, entièrement glabre. Tiges translucides vert clair à blanchâtre, aqueuses et fragiles. Feuilles simples, alternes, entières, arrondies-triangulaires à ovées de L 1,5-2,5 x l 1,5 x 3,5 cm avec une base arrondie ou échancrée et une extrémité ± pointue. Limbe vert clair translucide composé de 5 nervures principales Pétiole de longueur 6-12 mm. Epis terminaux et axillaires grêles, dressés, de longueur allant de 1,5 à 5 cm. Drupe de 0,5 mm de longueur environ, de forme ellipsoïde à globuleux.

Encore une fois, de nombreux thrips ont été trouvés sur cette plante.

Dieffenbachia seguine

Famille : ARACEAE

Altitude 0-600 m



Figure 20. Photographie de la plante adventive *Dieffenbachia seguine*

Florissant entre mai et juin, attention à son latex brûlant dangereux.

Plante terrestre, vivace, stolonifère, droit ou ascendant pouvant atteindre jusqu'à 1,90 m de hauteur. Ø de la tige d'environ 4-5 cm, marquée de nombreuses cicatrices annulaires. Pétiole vert, parfois tacheté, plus court que le limbe. Feuilles elliptiques-oblongues, de 20-60 cm de L x 10-25 cm de l avec une base de forme arrondie et un apex aigu. Le limbe se compose aussi parfois de petites tâches blanches. 9 à 15 paires de nervures latérales. Spathe vert pâle à tâches claires, L 18-30 cm x l 7-10 cm pour un Ø 1,5-2 cm, presque entièrement enroulée et fermée. Fleurs blanc-ivoire, stigmate brun noirâtre, baies rouge-orangé.

C'est l'espèce végétal sur lequel ont été retrouvés le plus grand nombre de thrips, quelque soit l'espèce, mais majoritairement une espèce non déterminée, peut-être *Hercinothrips femoralis*. Apparemment sa présence dans la bananeraie prospectée serait accidentelle. Donc il s'agirait d'une présence locale et on pourrait supposer que cette astéracée est inexistante ailleurs (à vérifier).

Alocasia cucullata

Nom vernaculaire : Chinese taro

Famille : ARACEAE



Figure 21. Photographie de l'adventice *Alocasia cucullata*

Plante pouvant atteindre jusqu'à 1,5 m de haut, constituée de plusieurs tiges ascendantes et ramifiée. Le pétiole peut mesurer 1 m au maximum. Les feuilles sont vertes claires, lustrées, plutôt épaisse, L 15-40 cm x l 10-28 cm et les nervures saillantes, incurvées vers l'apex.

Cette espèce végétale est très appréciée par *E. brevisetis* que l'on retrouve très nombreux sur les limbes d'*Alocasia*, mais on trouve aussi très souvent d'autres espèces (*Frankliniethrips vespiformis*, *Dinurothrips hookeri*, *Copidothrips octarticulatus*).

Mikania Micrantha

Nom vernaculaire : Lokaté

Famille : ASTERACEAE



Figure 22. Photographie de la plante adventive *Mikania micrantha*

Herbe lianoïde rampante et grimpante, glabre ou pubescente. Feuilles opposées, de L 4-16 cm x l 2-12 cm, en forme de cœur, avec un limbe dont la base est échancrée, la marge ondulée et légèrement dentée ainsi qu'un apex acuminé. Fleurs blanches réunies en de petits capitules très réduits portés par de longs pédoncules. Ces fleurs portent des akènes noirs d'une longueur de 2 mm possédant une aigrette de poils blancs, puis roses ou beiges.

Cette plante est très envahissante des milieux, et on la retrouve dans les bananeraies, notamment grimpante sur quelques pseudo-troncs. Sur le terrain, on y observe exclusivement *D. hookeri*.

Annexe 11 :

- ADN
- Taq polymérase, désoxyribonucléotides, tampons et stabilisants,
- Primers Forward et Reverse



Une fois le mélange réactionnel constitué, placé les tubes dans un thermocycleur qui va permettre que la PCR ait lieu. La PCR est une méthode qui permet d'amplifier, c'est-à-dire de copier en grand nombre, une séquence d'ADN à partir d'une faible quantité de départ. Ce procédé d'amplification exponentielle a lieu in vitro et fait intervenir des cycles successifs de dénaturation de la matrice de départ, puis d'appariements (hybridation) d'amorces (primers) sur cette matrice, et enfin de réplication d'ADN à l'aide d'une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase).

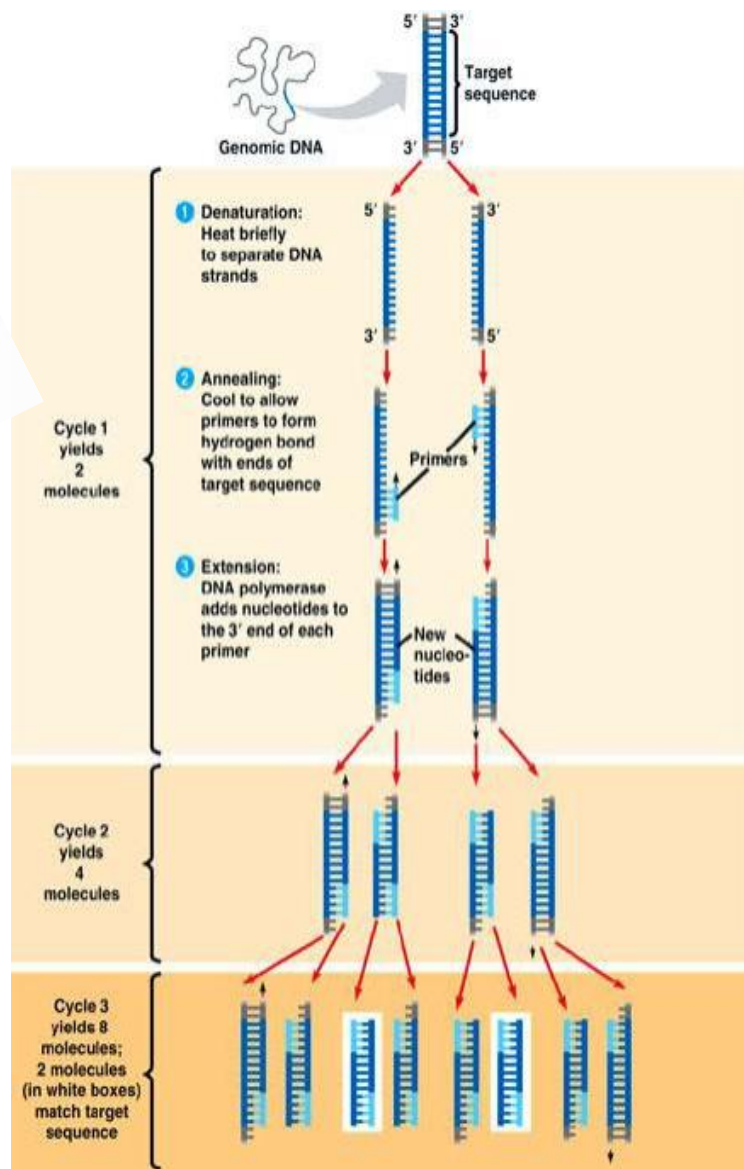


Figure 23. Explications et schémas du principe de la PCR

Annexe 12 Protocole d'extraction de l'ADN

1. Placer le ou les insecte(s) dans un microtube de centrifugation 1.5ml et ajouter 180µl de tampon ATL. Ecraser les thrips avec un micropilon dans le tube.
Centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1 min et récupérer le surnageant.



Ne pas oublier de préparer un échantillon **TEMOIN**, avec de l'eau pure (*fournie avec le kit MasterMix Qiagen*), du MasterMix et les primers dans les mêmes proportions qu'auparavant.

2. Ajouter 20µl de protéinase K, homogénéiser au vortex et incubé plusieurs heures à 56°C.
La lyse est complète en 1-3 h. Peut durer toute la nuit.

3. Vortexer 15s. Ajouter 200µl de tampon AL. Vortexer. Ajouter 200µl d'éthanol pur. Vortexer.
Le tampon AL et l'éthanol peuvent être mélangé au préalable.

4. Pipeter la mixture dans une colonne filtrante DNeasy Mini, placée dans un tube de collecte 2ml. Centrifuger à 6000g pendant 1min. Eliminer le tube de collecte et son contenu.

5. Placer la colonne filtrante dans un nouveau tube de collecte 2ml. Ajouter 500µl de tampon AW1. Centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1min. Eliminer le tube de collecte et son contenu.

6. Placer la colonne filtrante dans un nouveau tube de collecte 2ml. Ajouter 500µl de tampon AW2. Centrifuger à 20000g (14000rpm) pendant 3min. Eliminer le tube de collecte et son contenu.
Sortir la colonne filtrante avec précaution, elle ne doit pas entrer en contact avec le contenu du tube de collecte.

7. Transférer la colonne filtrante dans un nouveau centrifuge tube 1.5 ou 2ml (non fourni). Chauffez tampon AE à 50°C pour améliorer le rendement de l'élution. Ajouter 200µl de tampon AE pour l'élution. Incuber 1min à température ambiante.

Centrifuger 6000g pendant 1min.
Répéter cette étape 2 à 3 fois pour un meilleur rendement.

Conservation du tube à -20°C pendant plusieurs mois, voire années.

Protocole thermocycleur / PCR

1. A partir de l'ADN extrait, préparer dans chacun des puits d'une **plaque PCR 96** ou dans des **microtubes PCR** le mélange suivant :

- **12µl** d'ADN
- **15µl** de MasterMix (solution prête à l'emploi contenant Taq, dNTP, tampons, stabilisants)
- **1.5µl** de primers FORWARD (LCO)
- **1.5µl** de primers REVERSE (CO1)

2. Placer la **plaque PCR 96** ou les **microtubes PCR** dans un thermocycleur.

2 thermocycleurs sont disponibles au laboratoire de biologie moléculaire (labo n°101), un pour les plaques 96 (Tgradient®), et l'autre pouvant contenir jusqu'à 48 échantillons (Tpersonal®).

Le programme du thermocycleur choisi pour la PCR doit correspondre aux primers utilisés.

*Pour **LCO** et **C1-N-1777** :*

Sur le gros thermocycleur (Tgradient®)

Dossier REMI / programme n°1 «C1N42-46 ». La durée du programme est d'environ 2h40.

*Pour **LCO** et **HCO** (primers CO1 classiques) :*

Sur le gros thermocycleur (Tgradient®)

Dossier GREG/ programme n°52 « GR »

3. On obtient donc **30µl de produits PCR par extrait ADN**, que l'on peut **conserver** au **congélateur** pendant une **longue période** et au réfrigérateur de quelques heures à une journée.

Electrophorèse sur gel d'agarose

Electrophorèse de vérification :

Les produits PCR précédemment préparés sont ensuite utilisés pour effectuer **une électrophorèse sur gel d'agarose** afin de s'assurer que l'on a bien amplifié la bonne séquence au cours de la PCR, et que le témoin négatif ne contient pas de trace d'ADN.



Un gel d'électrophorèse avec le témoin négatif qui s'avère positif signifie que la PCR a été polluée. Il est dans ce cas nécessaire de refaire les étapes précédentes d'extraction et de PCR.

- 1. Préparer la zone de coulage** du gel. Il faut **équibrer** le support de sorte à ce qu'il soit parfaitement horizontal (vérifier avec les niveaux) avant d'y poser le moule et les cales. On place également les peignes désirés (servant à former les puits dans le gel) sur le moule pour le coulage du gel .
- 2. Préparer un gel d'agarose à 2%** (soit $2\% \times X$ d'agarose de biologie moléculaire pour X ml de TAE).
Au minimum, on mélange **1.2g d'agarose** pour **60 ml de TAE**. Il est recommandé de mélanger **1.8 g d'agarose** pour **90 ml de TAE** afin d'obtenir un gel facilement manipulable (car peu fragile).
- 3. Mesurer** la quantité de **TAE** désirée et la verser dans un Erlenmeyer.
- 4. Peser** la quantité **d'agarose** désirée puis la **verser** dans l'Erlenmeyer contenant le TAE.
La pesée s'effectue dans la pièce à côté du laboratoire de biologie moléculaire n°101 (labo Phytopathologie/salle des milieux, labo n°102), celle-ci disposant d'une balance précise (Sartorius CPA323S®), de matériel facilitant la pesée et d'un four à microondes.
- 5. Passer le mélange au four à microondes à 650W** pendant **2min** environ.
Il faut s'assurer que tout l'agar est bien dissous avant de couler le gel. Si nécessaire, remettre le mélange quelques secondes supplémentaires. Attendre ensuite 3 minutes environ avant de couler le gel sur son support.
- 6. Laisser le gel refroidir** afin qu'il polymérise avant d'être utilisé pour l'électrophorèse. Environ 3h sont nécessaires à ce qu'il refroidisse.
*Il est possible de couler 2 tailles de gel : **40 puits** (Fisherbrand®) ou **88 puits** (ThermoMaxicell Primo®).*
- 7. Couler délicatement le gel dans son moule**, de façon continue (débit constant), sans faire de bulle !
Supprimer les éventuelles bulles d'air à l'aide d'un cône 20E.
- 8. Plonger le gel avec son moule dans la cuve correspondante**, préalablement rempli de TAE.
Les puits du gel doivent être bien immergés (se référer au niveau maximum inscrit sur le support).
- 9. Découper une bande de Parafilm®**, sur laquelle on dispose **1µl de bleu de charge** * **le nombre de produits PCR** que l'on veut faire migrer.
Il est nécessaire de charger les produits PCR avant de remplir les puits.
On prélève **5µl de produit PCR**, et on mélange cette quantité avec **1µl de bleu de charge** par flux/reflux dans le cône sur le **Parafilm®**. On remplit ensuite les puits un par un.



Ne pas oublier de mettre le marqueur de taille dans un des puits !

Plus l'électrophorèse est longue et le voltage bas, et plus les résultats de la migration seront propres. Ainsi, nous lancerons une électrophorèse d'une durée de 45 minutes à 90V donnent de bons résultats.

Révélation au BET

Le gel ayant servi à l'électrophorèse doit maintenant être révélé au BET.

1. A la fin de la migration, **sortir le gel** avec son support du TAE. Ouvrir la porte de la salle BET, et la refermer rapidement, **ouvrir le bac de BET et y déposer le gel**. Enfin, **Jeter** les gants nitrile dans la poubelle « biohazard ».

Le BET (bromure d'ethidium) est une molécule s'intercalant entre les bases de l'ADN, utilisée en biologie moléculaire pour sa fluorescence sous lumière UV. Bien évidemment, sa capacité de liaison concerne aussi bien l'ADN purifié contenu dans un tube ou une piste de gel, que l'ADN de l'utilisateur. C'est un agent mutagène puissant dont la manipulation n'est pas anodine.

Le bac de BET et le bac de rinçage sont posés sur une table recouverte de plastic jaune « biohazard ». Tout contact avec le matériel de cette zone nécessite de jeter les gants avant de ressortir de la pièce. Le port de la blouse, de manches longues, de pantalon et de gants en nitrile sont obligatoires. Il faut veiller à maintenir cette pièce fermée car le BET est photosensible, il se dégrade donc à la lumière.



2. Laisser le gel **tremper 15 à 20 minutes** dans le bain de **BET**.

Pendant, ce temps, il faut préparer un sopalin imbibé d'eau distillée afin de nettoyer par la suite la plaque sous la lampe UV (du fait du pH extrêmement acide du BET). On allume l'ordinateur permettant l'acquisition de la photo sous UV.

3. Remettre des gants pour **sortir le gel** du **BET** à l'aide de la pelle prévue à cet effet. Puis placer le gel dans le **bac de rinçage** pendant **1 à 2 minutes environ**.
4. **R ressortir** le gel, et le placer sous le visualiseur, sous la lampe UV et enlever les gants. Allumer la lampe à l'aide du bouton ON/OFF située sur l'appareil à UV, et démarrer le logiciel « PerfectImage® ». L'acquisition se fait à l'aide du bouton en haut à gauche représentant un appareil photo.

(Extraction sur gel)*

Si les résultats de l'électrophorèse de vérification sont satisfaisants (bandes bien définies, quantité d'ADN suffisante, témoin non pollué, etc.), on peut procéder à l'extraction de l'ADN sur gel. Il est également possible d'extraire directement l'ADN depuis les produits PCR, mais il est plus sûr de le faire sur gel, afin d'être certain de prélever le bon fragment (*dans l'éventualité où la PCR aurait amplifié plusieurs séquences de tailles différentes*).

Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN, 20µl de produit PCR doivent être utilisés pour chaque échantillon (30µl de produits PCR ont dû être préparés à l'étape précédente).

Si l'on utilise un gel coulé sur la Fisherbrand®, il faudra remplir 3 puits avec 7µl de produit PCR pour chaque échantillon. Il est possible de mélanger directement le bleu de charge dans le produit PCR avant de faire l'électrophorèse, dans les proportions suivantes : 1 volume de bleu pour 5 volumes de produit PCR.

1. Une fois l'électrophorèse terminée, **découper les bandes d'ADN sur le gel** à l'aide d'un scalpel neuf.
Pour ce faire, il convient de démonter le visualiseur de la lampe UV, et de placer la plaque de

plexiglass entre la lampe et la personne qui va extraire les bandes de gel. Elle doit porter des manches longues, scotchées aux gants afin d'éviter tout risque de contamination, ainsi que des lunettes de protection UV.

Les 3 fragments de bandes de chaque échantillons sont regroupés **dans un tube Eppendorf® 2ml** préalablement numéroté. Peser chaque tube contenant les bandes d'agarose en ôtant le poids du tube. Un tube Eppendorf® 2ml pèse environ **1.1g**.

2. Ajouter le volume désiré de tampon QG dans le tube Eppendorf® 2ml.

Le volume de tampon à ajouter (µL) équivaut à 3 * le poids d'agarose découpée (mg).

Pour 300 mg d'agarose → 900 µl de tampon QG. Par soucis de simplicité, on prend la valeur la plus élevée que l'on ajoute à tous les tubes.

3. Incuber à 50°C pendant 10 minutes (ou jusqu'à ce que le gel soit complètement dissous) à l'aide du thermomixeur, réglé sur 600 rpm au moins.

4. Vérifier que la couleur de la mixture est jaune après que le gel ait été dissolu.

Si la couleur de la mixture est orange ou violette, ajouter 10µl of 3M acetate de sodium, pH 5.0, et mixer. L'adsorption de l'ADN sur la QIAquick column n'est efficace qu'à un pH ≤7.5. Le tampon contient un indicateur de pH qui est jaune lorsque le pH est ≤7.5, et violet ou orange si le pH est ≥7.5.

5. Ajouter 1 volume d'isopropanol par volume de gel (400µl d'isopropanol pour 400mg de gel, poids de gel déjà pesé à l'étape 2).

L'ajout d'isopropanol accroît les rendements de l'extraction d'ADN pour des fragments <500 pb et >4kb, aucun effet sur les fragments >500pb et < 4kb.

6. Placer des QIAquick spin column® dans des tubes 2ml numérotés (qui servent de tubes de collecte).

7. Pipeter le contenu du tube dans la colonne, et centrifuger pendant 1 minute à 17900 xg (13 000 rpm).

8. Eliminer le contenu du tube de collecte.

On réutilise les mêmes tubes de collectes afin de réduire les déchets plastiques.

9. Ajouter 0.5 ml de tampon QG dans la colonne, et centrifuger pendant une minute à 17900 xg (13 000 rpm).

10. Ajouter 0.75 ml de tampon PE dans la colonne. Attendre entre 2 et 5 minutes et centrifuger 1 minute pour laver l'ADN.

11. Eliminer le contenu du tube de collecte et **re-centrifuger pendant 1 minute à 17 900 xg** (13 000rpm).

12. Placer la colonne dans un nouveau tube Eppendorf 1.5 ml.

13. Pour éluer l'ADN, ajouter **50 µl de tampon EB** (10 mMTris Cl, pH 8.5) au centre de la membrane de la colonne et centrifuger pendant 1 minute à 17 900 x g (13 000rpm).

Conserver le tube de collecte numéroté et jeter la colonne.

IMPORTANT : Il faut s'assurer que le tampon d'élution est bien dispensé directement au centre de la membrane de la colonne pour une élution complète de l'ADN attaché à la membrane. Le volume élué moyen est de 48 µl pour 50µl de tampon, et de 28 µl pour 30µl de tampon.

*L'extraction sur gel n'a jamais été entreprise, la révélation aux UV étant insatisfaisantes

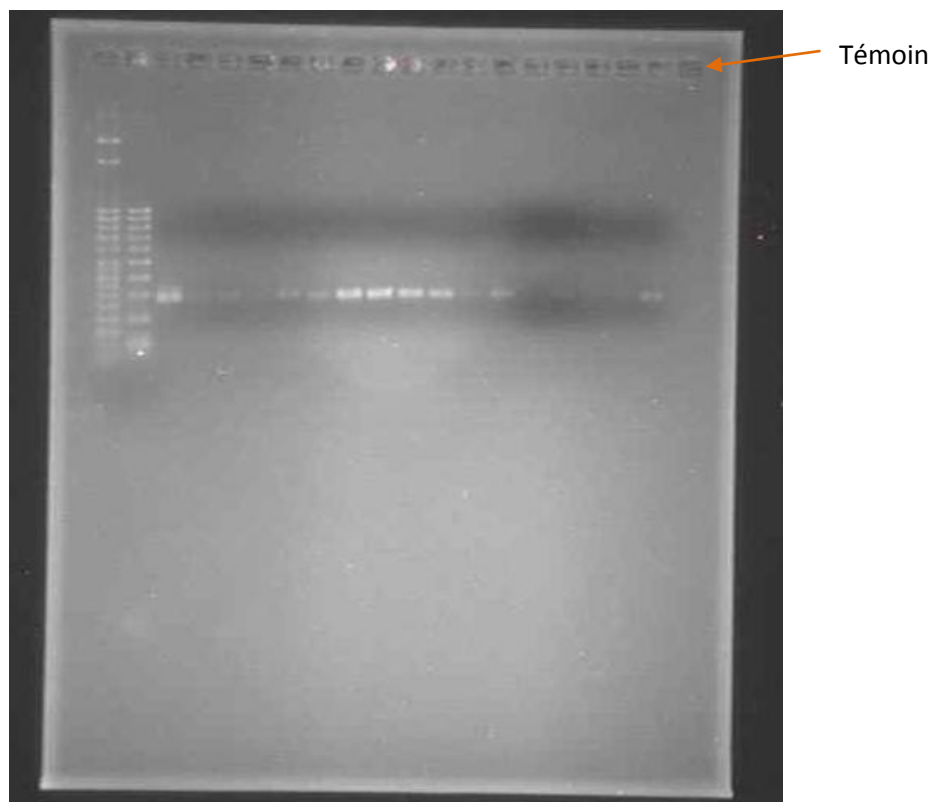


Figure 24. Photographie d'un gel d'électrophorèse révélé aux UV

WEBOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHIE

- <http://www.barcodinglife.com/>
- <http://www.ento.csiro.au/thysanoptera/index.php>
- http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/e_brevis.htm
- <http://www.dnalc.org/resources/animations/>
- <http://www.wikipedia.org/>

Monographies :

- DELVARE Gérard et ABERLENC Henri-Pierre, *Les insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale, Clés pour la détermination des familles*, PRIFAS, Montpellier, 1989
- FOURNET Jacques and HAMMERTON John L., *Weeds of the lesser Antilles*, INRA, Paris, 1991
- MOUND L.A and KIBBY G., *THYSANOPTERA an identification guide*, CAB international, Oxford, 1998
- MAURICE José et al., *La flore adventives des cultures fruitières à la Martinique*, Fédération Régionale de Défense contre les Organismes nuisibles (FREDON), Fort-deFrance, 2008
- CORNILLON Pierre-André et al., *Statistiques avec R*, PUR Editions, Bonchamp-lès-laval, 2008

Articles scientifiques :

- STEINER Marilyn Y. and GOODWIN Stephen, *Methods for collecting and rearing thrips (Thysanoptera) and their natural enemies*, Australian Journal of Entomology 37, 1998, 101-106
- REY Frédéric, *Rouille argentée des bananes martiniquaises : distribution et méthode de lutte*, Fruits vol. 57, 2002, 3-10
- FRAVAL Alain, *Les thrips*, Insectes n°143, 2006, 29-34
- HARA Arnold H. et al., *Banana Rust Thrips Damage to Banana and Ornamentals in Hawaii*, College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), 2002, 4 pages
- VARGA Lukas, *Hercinothrips femoralis (Reuter, 1891) – a New Pest Thrips (Thysanoptera : Panchaetothripinae) in Slovakia*, Plant Protect Sci. vol.44, 2008, 114-118
- POMPANON François et al., *Who is eating what : diet assessment using next generation sequencing*, Molecular Ecology, 2011, 20 pages
- LIMA EFB and MILANEZ JM, *First Record of Elixothrips brevisetis (Bagnall) (Thysanoptera : Thripidae) in Brazil*, ESALQ/USP, 2012, 2 pages